

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра біоінформатики**

«На правах рукопису»

УДК \_\_\_\_\_

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ С.В. Горобець  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**Магістерська дисертація  
на здобуття ступеня магістра  
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**на тему: «Фізико-хімічні та деякі біологічні властивості позаклітинного  
лектину *B. Subtilis IMB B-7724*»**

Виконала:

Студентка VI курсу групи БМ-81мп

Чурай Ольга Ігорівна

\_\_\_\_\_

Керівник:

д.ф.-м.н., професор

Азнакаєв Е. Г.

\_\_\_\_\_

Консультант з експериментальної частини:

с. н. с. Інституту експериментальної паталогії,  
онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького, к.б.н.  
Федосова Н. І

\_\_\_\_\_

Консультант з розробки стартап проекту:

к.е.н., доцент Ткаченко Т.П

\_\_\_\_\_

Рецензент:

Доцент кафедри мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського Національного університету

імені Тараса Шевченка., к.б.н.

Рудик М. П.

\_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цій дипломній роботі  
немає запозичень з праць інших авторів  
без відповідних посилань.

Студентка \_\_\_\_\_

Київ – 2019

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**  
**Кафедра біоінформатики**

Рівень вищої освіти – другий (магістерський) за освітньо-професійною програмою

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ С.В. Горобець

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

### ЗАВДАННЯ

#### на магістерську дисертацію студентці

#### Чурай Ользі Огорівні

1. Тема дисертації «Фізико-хімічні та деякі біологічні властивості позаклітинного лектину *B. Subtilis* IMB B-7724»,

науковий керівник дисертації Азнакаєв Емір Гансевич, д.ф-м.н., професор  
 (прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом по університету від «\_\_» \_\_\_\_\_ 201 р. № \_\_\_\_\_

2. Термін подання студентом дисертації 04.12.2019р.

3. Об'єкт дослідження – лектин бактеріального походження; пухлинні клітини.

4. Предмет дослідження – гемаглютинуюча та цитотоксична активність зразків культуральної рідини та виділеного з неї лектину, молекулярна маса, однорідність, стабільність речовини.

5. Перелік завдань, які потрібно розробити:

1. Оцінити гемаглютинуючу та цитотоксичну активність позаклітинних метаболітів, які присутні в культуральній рідині *B. subtilis*, за різних умов аерації середовища росту мікроорганізму.

2. Провести порівняльний аналіз отриманих показників вивчення біологічної активності позаклітинних метаболітів, обґрунтувати найбільш оптимальні терміни для виділення лектину.

3. Провести дослідження однорідності отриманого лектину, визначити його молекулярну масу та амінокислотний склад.

4. Дослідити стабільність лектину до зміни показників навколишнього середовища: температури та рН

5. Розробити стартап-проект

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу презентація

7. Орієнтовний перелік публікацій:

Основні положення дипломної роботи викладені у статті Федосова Н. І. Біологічна активність позаклітинного лектину *B. subtilis* IMB B-7724 / Н. І. Федосова, Н.Л. Черемшенко, К. І. Гетьман, О. М. Караман, Т.В. Симчич, А. В. Іванченко, **О. І. Данилюк**, І.М. Воєйкова, Г. В. Діденко// Мікробіол. Журнал. – 2019, –Т.18, №14.

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Експериментальна частина	Федосова Н. І. С.н. с. Інституту експериментальної паталогії, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького, к.б.н		
Розроблення стартап проекту	Ткаченко Т.П., к.е.н., доцент		

9. Дата видачі завдання 02 вересня 2019 року

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1.	Визначення предмету дослідження	02.09. 2019 –08.09.2019	виконано
2.	Характеристика об'єкту дослідження	09.09.2019 – 15.09.2019	виконано
3.	Огляд літератури	02.09.2019 – 29.09.2019	виконано
4.	Визначення матеріалів і методів дослідження	30.09.2019 – 06.10.2019	виконано
5.	Виконання експериментальної частини	07.10.2019 – 27.10.2019	виконано
6.	Аналіз отриманих результатів	28.10.2019 – 03.11.2019	виконано
7.	Розроблення стартап проекту	04.11.2019 – 17.11.2019	виконано
8.	Оформлення магістерської дисертації	18.11.2019 – 02.12.2019	виконано

Студентка

(підпис)

О.І. Чурай

(ініціали, прізвище)

Науковий керівник дисертації

(підпис)

Е.Г. Азнакаєв

(ініціали, прізвище)

## РЕФЕРАТ

Магістреська десертация: 91 сторінок, 12 рисунків, 25 таблиця, 77 джерел.

Магістерська дисертация присвячена **актуальній** на сьогодні проблемі пошуку нових методів, які б дозволили підвищити ефективність лікування онкологічних хворих, забезпечили повноцінне функціонування імунної системи таких пацієнтів. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є застосування засобів імунотерапії, зокрема бактеріальних лектинів, які володіють не лише ад'ювантними властивостями, а й мають певну цитотоксичну по відношенню до пухлинних клітин дію.

**Метою** роботи є визначення ряду біологічних характеристик позаклітинного метаболіту *B. subtilis* IMB B-7724 та оцінка фізико-хімічних властивостей отриманого з культуральної рідини мікроорганізма лектину.

**Об'єкт дослідження** – лектин бактеріального походження; пухлинні клітини.

**Предмет дослідження** – гемаглютинуюча та цитотоксична активність зразків культуральної рідини та виділеного з неї лектину, молекулярна маса, однорідність, стабільність речовини.

В роботі було використано такі **методи дослідження**: мікробіологічні, культуральні, фізико-хімічні та статистичні методи.

У ході дослідження вперше було показано, що речовина, яка була виділена з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724 володіє гемаглютинуючою та цитотоксичною активністю, ступінь вираженості якої залежить від умов аерації культурального середовища. Визначено молекулярну масу речовини та показано молекулярний склад речовини. Одержаний лектин є термостабільним в діапазоні температур від 20 до 90° С і стійким до зміни рН середовища в діапазоні від 6 до 9.

ЛЕКТИН, *B. SUBTILIS* IMB B-7724, ПУХЛИННІ КЛІТИНИ,  
КУЛЬТУРАЛЬНА РІДИНА, ГЕМАГЛЮТИНУЮЧА АКТИВНІСТЬ,  
ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ

## ABSTRACT

Master's thesis: 91 pages, 12 drawings, 25 tables, 77 sources.

Master's thesis is devoted to the current problem of finding new methods that would improve the effectiveness of treatment of cancer patients, ensure the full functioning of the immune system of such patients. One way to solve this problem is to use immunotherapy, in particular bacterial lectins, which have not only adjuvant properties, but also have a certain cytotoxic effect on tumor cells.

The aim of this work is to determine a number of biological characteristics of the extracellular metabolite of *B. subtilis* IMV V-7724 and to evaluate the physicochemical properties of the lectin microorganism obtained from the culture fluid.

Object of study - lectin of bacterial origin; tumor cells.

The subject of the study is the hemagglutinating and cytotoxic activity of samples of the culture fluid and the lectin isolated from it, molecular weight, homogeneity, stability of the substance.

The following research methods were used in the work: microbiological, cultural, physicochemical and statistical methods. To study the cytotoxic effect of lectin used MTT test (calculation of IC, $\%$ ); cytolytic - a method of supervital staining of cells using trypan blue (counting the number of living and dead cells, $\%$ ) Statistical analysis of the results was performed using the Student's t-test.

In the course of the study, it was shown that a substance that was isolated from the culture fluid *B. subtilis* IMB B-7724 has hemagglutinating and cytotoxic activity, the severity of which depends on the aeration conditions of the culture medium. 18 The molecular weight of 18-20 kDa and in the molecular composition is dominated by such amino acids as leucine, alanine, phenylalanine and tyrosine. The resulting lectin is thermostable in the temperature range from 20 to 90<sup>0</sup> C and is resistant to pH change in the range from 6 to 9.

LECTIN, *B. SUBTILIS* IMV V-7724, TUMOR CELLS, CULTURAL LIQUID, HEMAGLUTYTING ACTIVITY, CYTOTOXIC ACTIVITY.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	10
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	13
1.1 Загальна характеристика лектинів .....	13
1.1.1 Виявлення і специфічність лектинів .....	14
1.1.2 Структурна характеристика лектинів .....	15
1.2 Основні біологічні функції лектинів .....	17
1.3 Можливий механізм реалізації цитотоксичного впливу лектинів .....	20
1.4 Перспективи використання лектинів у медицині .....	24
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	30
2.1 Матеріали досліджень .....	30
2.1.1 Штам мікроорганізму .....	30
2.1.2 Умови культивування .....	30
2.1.3 Біологічно активні препарати, що містять продукти мікробного синтезу .....	31
2.1.3.1 Фільтрат культуральної рідини (ФКР) <i>B. subtilis</i> 7724 .....	31
2.1.3.2 Лектин .....	31
2.1.4 Клітинні лінії .....	31
2.1.5 Експериментальна модель пухлинного росту .....	31
2.1.6 Експериментальні тварини .....	32
2.2 Методи досліджень .....	33
2.2.1 Отримання суспензії пухлинних клітин асцитного раку Ерліха .....	33
2.2.2 Визначення гемаглютинуючої активності .....	33

2.2.3 Визначення цитотоксичної активності (МТТ-тест) по відношенню до пухлинних клітин .....	33
2.2.4 Визначення цитолітичної активності .....	34
2.2.7 Визначення молекулярної маси лектину .....	35
2.2.8 Визначення вмісту амінокислот .....	36
2.2.9 Визначення амінокислотного складу .....	36
2.2.10 Визначення вуглеводної специфічності .....	37
2.2.11 Визначення рН-стабільності лектину .....	37
2.2.12 Визначення температурної стабільності лектину .....	38
2.2.13 Статистична обробка результатів .....	38
2.3 Результати та їх обговорення .....	39
2.3.1 Біологічна активність позаклітинних метаболітів, присутніх в середовищі росту <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 .....	39
2.3.2 Дослідження <i>in vitro</i> цитотоксичної та цитолітичної активності ЦФ КР <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 по відношенню до клітин раку Ерліха .....	40
2.3.3 Дослідження ряду фізико-хімічних та біологічних властивостей лектину, виділеного з культуральної рідини <i>B. subtilis</i> 7724 .....	46
2.3.3.1 Амінокислотний склад лектину .....	46
2.3.3.2 Дослідження вуглеводневої специфічності .....	48
2.3.3.3 Стабільність лектину до зміни температури та рН середовища .....	50
3 СТАРТАП ПРОЕКТ .....	52
3.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінностей .....	52
3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу .....	56

3.3 Визначення ключових факторів успіху .....	59
3.4 Визначення потенційних споживачів .....	61
3.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку.....	65
3.5.1 Основні фонди підприємства.....	65
3.5.2. Оборотні фонди підприємства.....	66
3.5.3 Розрахунок собівартості НДР .....	70
3.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту	
73	
3.7 Ризики стартап – проекту та методи управління ними .....	74
ВИСНОВКИ.....	83
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	84



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СИМВОЛІВ

ФГГ	– фітогемаглютинін
ІНФ	– інтерферон
ГАА	– гемаглютинуюча активність
ПК	– пухлинні клітини
КР	– культуральна рідина
РГА	– реакція гемаглютинації
ЦФКР	– центрифугат культуральної рідини
АРЕ	– Асцитний Рак Ерліха, спонтанна аденокарцинома молочної залози
ІЦ	– індекс цитотоксичності

## ВСТУП

Дослідження присвячені пошуку нових засобів для підвищення ефективності лікування онкологічних хворих обумовлені як постійним зростанням онкологічної захворюваності населення України, так і недостатньою ефективністю стандартних схем лікування. Агресивний вплив сучасних засобів хіміо- та променевої терапії на організм пацієнтів призводить до розвитку імуносупресії. Імунна система стає неспроможною забезпечити захист від розвитку рецидиву захворювання або виникнення метастазів. Підтримання функціональної активності ефektorів імунної системи на належному рівні сприяє формуванню у пацієнта повноцінної імунної відповіді на залишкові пухлинні клітини та покращенню результатів лікування. З цією метою поряд із застосуванням препаратів хіміотерапії часто використовують імунотерапевтичні засоби, зокрема, цитокіни, синтетичні індуктори інтерферону, різні типи протипухлинних вакцин.

Останнім часом увагу дослідників звертають на себе лектини – білки неімунної природи, які специфічно і зворотно зв'язують вуглеводи без порушення їх ковалентної структури. Вони присутні в будь-якій живій системі, відіграють провідну роль у процесах вуглевод-білкового розпізнавання і мають поліфункціональні властивості (мітогенні, імуномодуючі, протипухлинні).

На сьогодні існує значна кількість робіт щодо вивчення біологічних (в тому числі протипухлинних та імуномодуючих) властивостей лектинів, які виділені з різних джерел. Загалом протипухлинна дія лектинів виявляється в зв'язуванні ними певних молекул на поверхні пухлинної клітини (ПК) та ініціації процесів, що призводять до її знищення [1, 2]. Перспективними для дослідження в якості протипухлинних засобів є позаклітинні лектини, які продукуються сапрофітними бактеріями родини *Bacillus*. Показано, що більшість таких лектинів термостабільні, металонезалежні глікопротеїни, стійкі до дії рН, детергентів та тривалого зберігання; цим лектинам притаманна

рідкісна вуглеводна специфічність до сіалових кислот та сіаловмісних глікокон'югатів [3, 4], що і обумовлює перспективність їх використання. З точки зору біотехнологічного виробництва, процес отримання бактеріальних лектинів досить простий і можливий для стандартизації. Фізико-хімічні та біологічні властивості бактеріальних лектинів змінюються в залежності від штаму мікроорганізму, способу його культивування та методу виділення. Тому, в кожному окремому випадку необхідно детально вивчати та охарактеризовувати отриманий з середовища росту лектин.

**Актуальність теми.** Магістерська дисертація присвячена актуальній на сьогодні проблемі пошуку нових методів, які б дозволили підвищити ефективність лікування онкологічних хворих, забезпечили повноцінне функціонування імунної системи таких пацієнтів. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є застосування засобів імунотерапії, зокрема бактеріальних лектинів, які володіють не лише ад'ювантними властивостями, а й мають певну цитотоксичну по відношенню до ПК дію.

**Метою магістерської дисертації** було визначення ряду біологічних характеристик позаклітинного метаболіту *B. subtilis* IMB B-7724 та оцінка фізико-хімічних властивостей отриманого з культуральної рідини мікроорганізму лектину.

#### **Завдання дослідження:**

1. Оцінити гемаглютинуючу та цитотоксичну активність позаклітинних метаболітів, які присутні в культуральній рідині *B. subtilis*, за різних умов аерації середовища росту мікроорганізму.
2. Провести порівняльний аналіз отриманих показників вивчення біологічної активності позаклітинних метаболітів, обґрунтувати найбільш оптимальні терміни для виділення лектину.
3. Провести дослідження однорідності отриманого лектину, визначити його молекулярну масу та амінокислотний склад.

4. Дослідити стабільність лектину до зміни показників навколишнього середовища: температури та рН

5. Розробити стартап-проект

*Об'єкт дослідження* – лектин бактеріального походження; пухлинні клітини.

*Предмет дослідження* – гемаглютинуюча та цитотоксична активність зразків культуральної рідини та виділеного з неї лектину, молекулярна маса, однорідність, стабільність речовини.

**Методи дослідження.** В роботі було використано мікробіологічні, культуральні, фізико-хімічні та статистичні методи.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше було показано, що речовина, яка була виділена з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724 володіє гемаглютинуючою та цитотоксичною активністю, ступінь вираженості якої залежить від умов аерації культурального середовища. Визначено молекулярну масу речовини 18-20 кДа та показано, що у її молекулярному складі переважають амінокислоти лейцин, аланін, фенілаланін та тирозин. Одержаний лектин є термостабільним в діапазоні температур від 20 до 90° С і стійким до зміни рН середовища в діапазоні від 6 до 9.

**Практичне значення роботи.** Результати дослідження можуть бути використані при розробці нових схем лікування хворих на злоякісні новоутворення. Обумовлена використанням лектину активація системи протипухлинного імунітету та його цитотоксична активність по відношенню до пухлинних клітин зможе запобігти виникненню у таких хворих локальних рецидивів або метастазів.

**Апробація** Основні положення дипломної роботи викладені у статті Федосова Н. І. Біологічна активність позаклітинного лектину *B. subtilis* IMB B-7724 / Н. І. Федосова, Н.Л. Черемшенко, К. І. Гетьман, О. М. Караман, Т.В. Симчич, А. В. Іванченко, **О. І. Данилюк**, І.М. Воєйкова, Г. В. Діденко// Мікробіол. Журнал. – 2019, –Т.18, №14.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Загальна характеристика лектинів

Лектини - це білки неімунного походження, які широкого поширенні в природі, здатні виявляти та зворотно зв'язується з вуглеводами і глікокон'югатами, є вільними або пов'язаними з клітинними поверхнями за допомогою сайтів специфічного зв'язування [1]. Ці білки від інших макромолекул, які здатні зв'язувати вуглеводи, відрізняє їх здатність до аглютинації. В той час як антитіла структурно схожі один на одного, лектини відрізняються за амінокислотним складом, наявністю металів, трьохвимірною структурою і молекулярною масою. Крім того лектини існують як у тварин, так і у організмів без імунної системи таких, як рослин та бактерій.

Перший знайденим лектином був рицин (присутній в екстрактах *Ricinus communis*) та абрін (отриманий з екстрактів *Abrus precatorius*), які здатні до аглютинації клітин крові і є білками які інактивуються рибосоми (RIP) [2,3] які складаються з гетеродимерних білків з двома пептидними ланцюгами, які зчеплені разом дисульфідним зв'язком. [4]

Лектини, які здатні до аглютинації еритроцитів раніше називалися (фіто-) гемаглютиніни, фітоаглютиніни або рослинні аглютиніни [5]. Бойд і Шеплі [6] використовували термін лектин, щоб позначити клас білків, який має загальні характеристики селективності при взаємодії з вуглеводами. Цей термін був узагальнено Шароном і Лисом [7] щоб включити всі білки з різних джерел, неімунного походження і їх здатність зв'язувати вуглеводи, а також з або без специфічністю до різних груп крові еритроцитів.

У 1980, лектини були позначені Goldstein et al. [8] як білки неімунного походження, які мають два або більше сайтів зв'язування, що здатні взаємодіяти з вуглеводами.

Дослідження лектинів показали їх присутність у тварин, лишайників і бактерій, а також у вищих грибів [9] Фізіологічні функції, запропоновані для

багатьох лектини засновані на їх властивостях та місцях локалізації в різних тканинах. Наявність сайтів зв'язування для конкретних вуглеводів є основною характеристикою лектинів, безсумнівно, і є важливим фактором для визначення їх фізіологічних ролей.

### **1.1.1 Виявлення і специфічність лектинів**

Лектини у більшості випадків дво- або багатовалентні і здатні взаємодіяти з вуглеводами або глікопротеїнами в розчинах або здатні за допомогою сайтів зв'язування приєднуватись до клітинної мембрани при цьому утворювати розні оборотні зв'язки. Через цю здатність лектини легко виявляються при реакції аглютинації. Аналіз шгемаглютинації ( рис. 1 а) дозволяє легко переглядати аглютинацію еритроцитів.

Використання еритроцитів від різних людей та різних тварин, які були оброблені ферментативно [10, 11], хімічно [12, 13.], а також необроблені [12, 14] було виявлено, що лектини можуть бути специфічними до різних еритроцитів. Лектин віділені з *Cordyceps militaris* здатний до аглютинації еритроцитів мишей і щурів, але не здатний клітини групи АВО [11]; лектин з *Gracilaria ornata* здатний до аглютинації еритроцитів тварин (кроля і курки), але не людина [10].

Реакція гемаглютинації (рис 1 ) у присутності вуглеводів підтверджує виявлення лектину, зазначене попередніми аналізами гемаглютинації; крім того, для оцінки зразків лектину використовують реакції преципітації полісахаридів або глікопротеїну [15].

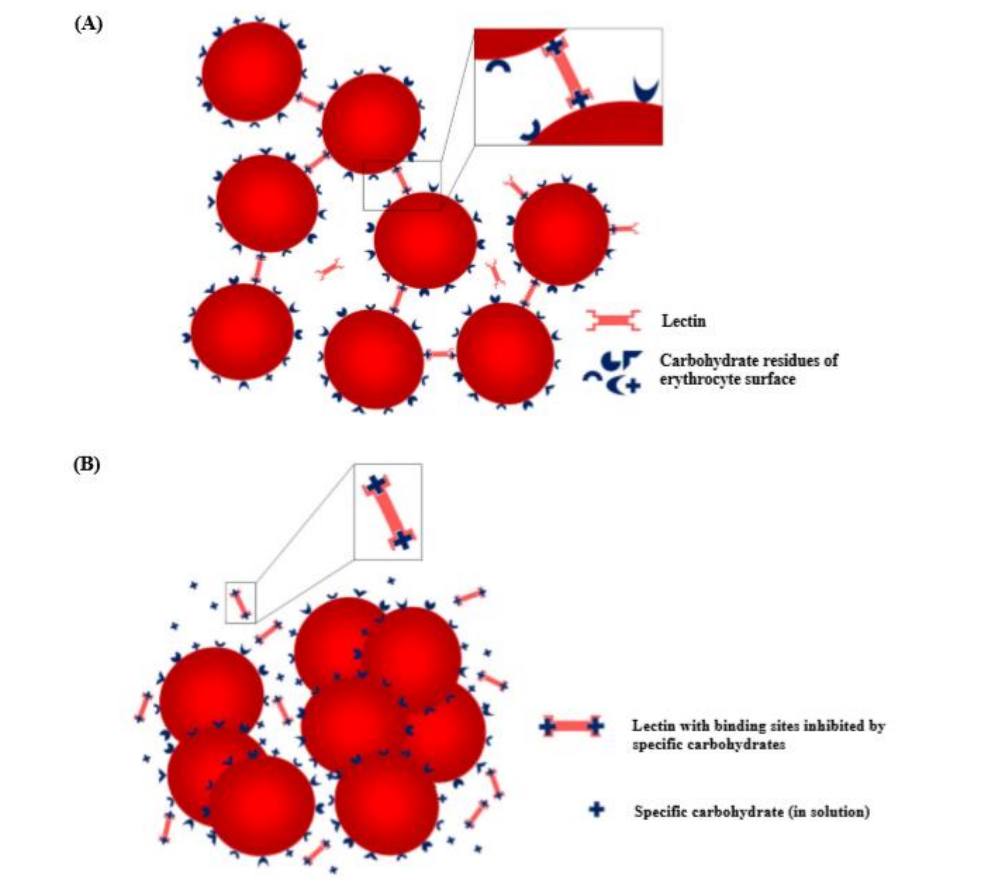


Рисунок 1 – Реакція гемаглютинації

Ван та ін. [17] показали інший варіант виявлення специфічної здатності лектинів зв'язувати вуглеводи. В цьому аналізі було використано різні моносахаридно- поліакриламідні кон'югати в якості захоплюючих речовин для скринінгу лектинів у біологічних зразках. Цей аналіз, більш чутливий, ніж звичайний аналіз гемаглютинації, забезпечив альтернативне та ефективне виявлення лектинів.

Лектини специфічні для моносахаридів або олігосахариди. Проте, деяке інгібування лектина зустрічається тільки з олігосахаридами [18], глікопротеїнами і / або полісахаридами [19 ]

### 1.1.2. Структурна характеристика лектинів

Специфічність лектинів до вуглеводів, визначається тривимірною структурою сайтів їх зв'язування [20]. Ці молекули виявляють велику схожість

своїх залишків, включаючи ті, що беруть участь у зв'язуванні з моносахаридами, більшість з яких координуються іонами металів, які необхідні для цілісності субодиниць та правильного розташування залишків [21.]. Лектини можуть мати іони металів та взаємодії, координовані молекулами води та вуглеводами [22]. Ці білки можуть представляти від 2 до 12 сайтів зв'язування, залежно від характеру молекули та стану олігомеризації [23].

Структурні відмінності мають лектини від первинної структури до останнього ступеня молекулярної організації; вони можуть відрізнятися за амінокислотою послідовністю, змінювати кількість субодиниць та характер поліпептидів. Взаємодія між субодиницями, можливо, відіграють домінуючу роль у стабільності цих білків [24].

Особливості та спорідненість асоційованих ділянок досягаються головним чином водневими мостами, включаючи сили Ван дер Ваальса та гідрофобні взаємодії із залишками ароматичних амінокислот, близьких до гідрофобних частин моносахаридів [25], що сприяють стабільності та специфіки сформованих комплексів.

Моделювання молекулярної динаміки показало, що лектини структурно гнучкі. Наявність іонів у навколишньому середовищі може визначати, чи існує взаємодія між лектином та вуглеводами, і чи ця взаємодія покращується чи ні конкретним іоном. Крім того, концентрація іонів може передбачати зустріч вуглеводних мономерів, утворюючи міцели в гідрофобних ділянках лектинів. Складність зв'язування молекули стабілізується багатьма або хоча б одним водневим містком. Ці аналізи продемонстрували, що специфічні та сприятливі електростатичні взаємодії між амінокислотними залишками лектину та мономерами ліганду полегшують зв'язування комплексу. Специфічні (водневі зв'язки та електростатичні) або неспецифічні (ван дер Ваальс) взаємодії становлять основний внесок у міцність та стабільність молекулярного комплексу [26.].



## 1. 2. Основні біологічні функції лектинів

Лектини зустрічаються всюди в природі. Вони здатні зв'язуватися з розчинним вуглеводом або / та його фрагментом, що входить до складу гліколіпиду або глікопротеїну. Вони, як правило, агглютинують певні тваринні клітини або/ та осаджують глікокон'югати. Переважна більшість лектинів не має ферментативної активності.

Лектини у тварин регулюють синтез глікопротеїнів клітинну адгезію, та рівень білка в крові. Також беруть участь у зв'язуванні розчинних міжклітинних та позаклітинних глікопротеїнів. Лектини відіграють роль рецепторів на клітинній поверхні печінки ссавців для того, щоб розпізнати залишки галактози, для виведення певних глікопротеїнів з кровоносної системи. Як рецептор здатний розпізнавати гідролітичні ферменти, що містять маннозу-6-фосфат, та спрямовує ці білки для доставки у лізосоми.

Відомо, що лектини відіграють важливу роль у вродженій імунній системі. Лектини, які зв'язують маннозу, допомагають захистити організм проти мікроорганізмів, що вторглися у нього. Інші імунні лектини відіграють певну роль у самозабезпеченні, та вони, можливо, здатні модулювати запальні та автореактивні процеси. [27]

Інтелектини (лектини типу X) зв'язують мікроорганізмові глікани і також можуть функціонувати у вродженому імунитеті. Вони можуть бути залучені до розпізнавання образів і усуненні патогенів у вродженому імунитеті хребетних тварин, включаючи риб. [28]

Зі зростанням рослин, велика концентрація лектинів у насінні зменшується – це говорить про роль лектинів у проростанні рослин та, можливо, у виживанні самого насіння. Вважають, що ще однією з функцій лектинів у рослин є здатність зв'язувати глікопротеїни на поверхні паразитарних клітин. Також було виявлено, що деякі рослинні лектини розпізнають неуглеводні ліганди, які мають переважно гідрофобний характер, включаючи ауксини, цитокіни, аденін, та індол оцтову кислоту, а також водорозчинні

порфірини. Оскільки частина цих молекул здатна функціонувати як фітогормон – ці взаємодії можуть бути фізіологічно важливими [29].

Деякі вірусні глікопротеїни гепатиту С здатні приєднуватися до лектинів типу С на поверхні клітин печінки, щоб ініціювати інфекцію. [30] Патогени здатні експресувати поверхневі ліганди, такі як адгезини та гемаглютиніни, щоб проникнути в організм та оминати вроджену імунну систему. Ці ліганди зв'язуються зі специфічними для тканин гліканами на поверхні клітини. [31]

Лектини викликають ряд імунологічних реакцій, в тому числі агглютинацію клітин, що включає агглютинацію еритроцитів (звідси синонім – фітогемаглютиніни, що зазвичай використовують стосовно лектинів квасолі), також вони викликають преципітацію (осадження) глікопротеїнів [32]. Цю активність пригнічують гаптени, в ролі яких виступають вуглеводи. Лектини також розглядаються як компоненти імунної системи, як еволюційні попередники антитіл. Вони забезпечують бактерицидну дію по відношенню до певних видів патогенних бактерій і здатні інактивувати дію деяких вірусів.

Важливою є здатність лектинів регулювати імунну відповідь через активацію системи комплементу. Ця система належить до вродженого імунітету та забезпечує розпізнавання чужорідних білків. Лектин зв'язуючись з манозними вуглеводними залишками компонентів цієї системи запускає процес активації системи комплементу. Встановлено [33], що ендogenousні та екзогенні лектини, а також ФГА квасолі індують перехід клітин зі стадії G2 в мітотичну, тобто у них присутня мітогенна активність по відношенню до різних субпопуляцій лейкоцитів і викликаючи їх бласттрансформацію. Підсилення Т-клітинної цитотоксичності і підсилення виділення ряду цитокінів імунною системою є ще однією властивістю ендogenousних лектинів.

Для функціонування імунної системи важливою є здатність лектинів розпізнавати вуглеводи і зв'язувати їх на поверхні клітинних мембран клітин-мішеней та забезпечувати цим ряд важливих функцій імунокомпетентних клітин: активація антигенпрезентуючих клітин (макрофагів, дендритних клітин)

розпізнавання чужорідних рецепторів, лізис чужорідної клітини, індукція процесів апоптозу [34].

### 1.3 Можливий механізм реалізації цитотоксичного впливу лектинів

Як відомо клітина поверхня являє собою досить важку мозайку, яка складається з подвійного шару фосфоліпідів, різних білків, глікопротеїнів та гліколіпідів (рисунок 2).

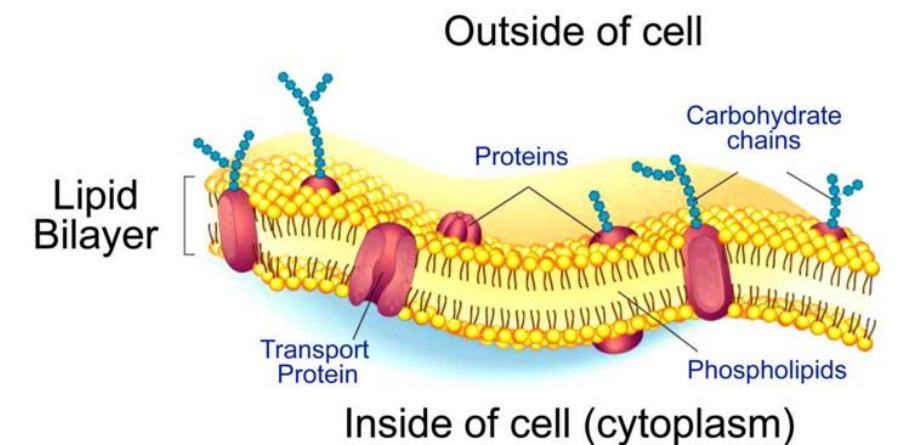


Рисунок 2 – Структура клітинної поверхні

Останні два класи сполук містять у своєму складі гетероолігосахариди, які складаються складаються із різних моносахаридних залишків, таких як галактоза, глюкоза, фукоза, маноза, сіалові кислота та інші. Багаточисленним дослідженням було встановлено, що зміну цих структур супроводжують процеси злоякісного росту пухлин. При трансформації кліткової поверхні існує декілька характерних особливостей:

1. Відбувається збільшення кількості розплетених олігосахаридних ланцюгів.
2. Збільшується експресія генів сіалових кислоти в термінальному положенні тобо кінцевому [35].

Відомо, що лектини здатні приєднувати вуглеводневі залишки, тому всі ці зміни легко відслідити за допомогою даного білку.

Оскільки шлях індукування апоптозу лектинами мікробного походження ще недокінця вивчено, можна вважати, що він схожий на механізм рослинних

лектинів. Тому даний шлях загибелі клітин розглянемо на прикладі рослинного лектину Конканаваліну А, який виділений з *Canavalia ensiformis* [36].

Апоптоз (грец. Ἀπόπτωση - «листопад», від ἀπό- + πτῶσις «падіння») - регульований процес програмованої клітинної загибелі, в результаті якого клітина розпадається на окремі апоптотичні тільця, обмежені мембраною. Фрагменти загиблої клітини зазвичай дуже швидко (в середньому за 90 хвилин [37]) фагоцитуються макрофагами або сусідніми клітинами, минаючи розвиток запальної реакції. Апоптоз відбувається через два основні шляхи, зовнішній шлях, викликаний рецепторами смерті і мітохондріальнозалежний шлях, який спричиняє вивільнення цитохрому С.

Мітохондрії є основним фактором, що активує та пригнічує загибель клітин. При мітохондріальному шляху запуску каспазного каскада ключовою ланкою є зміна стану мітохондрій. Виділяють три фази даного апоптозу, що включає:

1. Премітохондріальна, на якій відбувається активація шляхів пошкодження
2. Мітохондріальна, яка пов'язана зі зниженням функцій мітохондрій
3. Постмітохондріальна, яка проявляється виділенням з мітохондрій активних проапоптотичних компонентів, що призводять до гибелі клітин [38].

Мітохондріальний шлях (рисунк 3) апоптозу ініціюється пошкодженням ДНК або дією на клітину цитотоксичних агентів. Важливим білком, що відповідає за пошкодження ДНК є p53 – це транскрипційний фактор, що регулює клітинний цикл. Білок p53 знаходиться в латентному стані і активується не тільки у відповідь на пошкодження ДНК, але й в наслідок гіпоксії, активації онкогенів, дії цитотоксичних агентів, опромінювання та високої концентрації монооксида азоту [39]. p53 відіграє ключову роль в регулюванні контрольних точок клітинного циклу, апоптоз, цілісність геному і репарація ДНК.

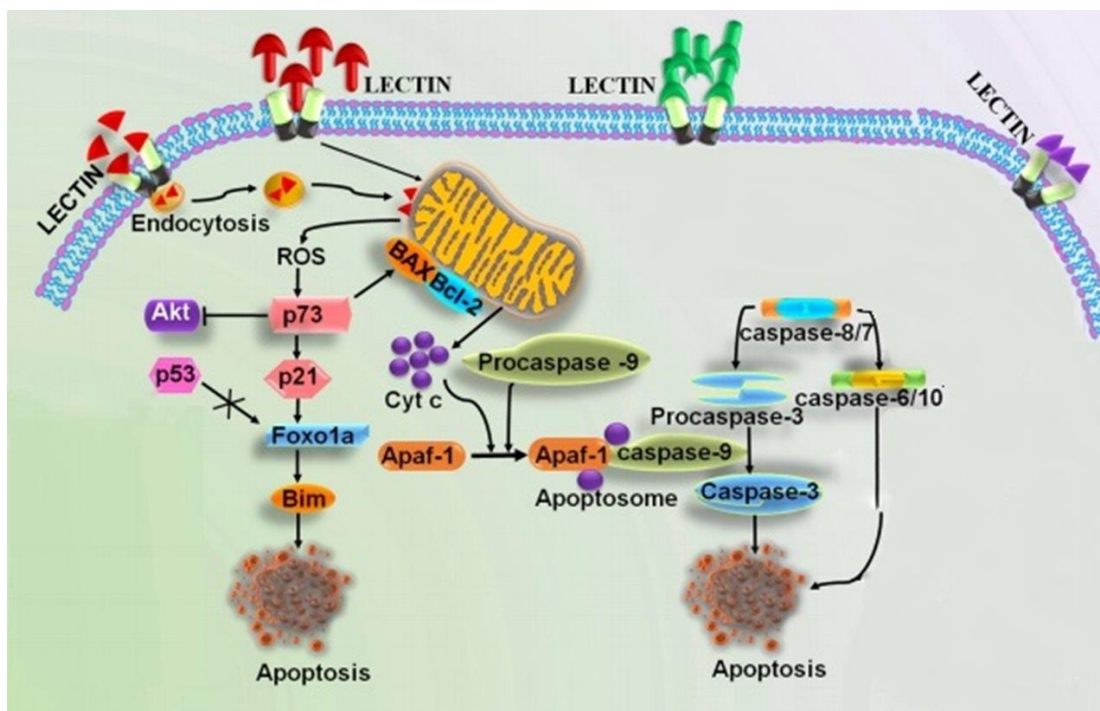


Рисунок 3 – Можливий механізм регулювання цитотоксичної активності лектину

У більшості людей у деяких клітинах p53 є функціонально неактивними, мутантам або дефектними. [40]. ConA вибірково індукує апоптоз в p53-нульових клітинах і не впливає на нормальні клітини. У клітинах при відсутності p53, p73 часто надекспресуються і він визначає клітинну чутливість. Конканавалін А стимулює активацію p73 і, таким чином, індукує p73-залежний апоптоз, і впливає на відношення Bax / Bcl-2, який блокує шлях Akt, і активує передачу сигналів Foxo1a-Bim. [39]. В даному випадку ROS (вільні форми кисню) діють як регулятори Con A індукованої експресії p73. Експресія p73 активує p21 і підвищує співвідношення проапоптичного білка Bax до антиапоптичного білка Bcl2. p73 блокує активацію Akt і передає сигнали на Foxo1a-Bim і відбувається апоптоз.

Коли в клітині є приступний ген p53 він активує гени Bax, що призводить до утворення вільних форм кисню (ROS).

На зовнішній мембрані мітохондрій локалізована велика частина білкова сімейства Bcl-2 (BH, Bcl-2 homology domain). Сімейство цих білків поділяють на дві групи:

- Індуктори апоптозу: Bim, Bad, Bid – BH-1; Bax, Bak, Bok – BH-1, BH-2, BH-3.

- Інгібітори апоптозу – Bcl-2, Bcl-w, Al – BH-1, BH-2, BH-3, BH-4; Mcl-1, Bcl-x<sub>L</sub> – BH-1, BH-2, BH-3.

BH-3 білки є первинними ініціаторами апоптозу і знаходяться в прямому антагонізмі з антиапоптозними сполуками сімейства Bcl-2. Від співвідношення активності цих білків залежить відбудеться апоптоз чи ні.

Проапоптичні білки групи Bcl-2 мають COOH-кінцевий гідробобний регіон, який відповідальний за прикріплення до мембрани мітохондріальної мембрани в місцях зближення зовнішньої та внутрішньої мембрани, де існують фізіологічні пори (мегаканли, канали для Ca, вольтажа, pH, активних форм кисню), в нормі цитохром C не може пройти через ці канали. Білки Bcl-2 (Bax, Bim і т.д.) тимчасово утворюють мегаканали, по яким в цитоплазму поступає цитохром C і інші фактори апоптозу [42].

Цитохром C являє собою білок з молекулярною масою 15 кД, який кодується ядерним геном, імпортується в мітохондрію, де прикріплюється до внутрішньої поверхні мембрани. Цитохром C необхідний для утворення апоптосоми, у якій активується Каспаза 9. Після виділення цитохром C зв'язується з активатором апоптозної протеази Araf-1 і АТФ, які після цього зв'язуються з прокаспазою – 9, щоб створити білковий комплекс, який відомий як апоптосома. Апоптосома розщеплює прокаспазу на її активну форму каспазу-9, яка в свою чергу активує ефektorну каспазу-3. Каспаза 3 кінцева ланка у схемі апоптозу клітини [43,44].

#### **1.4 Перспективи використання лектинів у медицині**

Лектини – загальна назва глікопротеїнів та білків неімунного походження, які здатні вибірково зв'язуватися з вуглеводами. Схожі вуглевод-білкові взаємодії складають основу великої кількості фізіологічних процесів, які протікають в організмі. За допомогою їх відбувається адгезія мікроорганізмів і окремих клітин до тканин, вони беруть участь у формуванні імунної відповіді на різні патогени і забезпечують міжклітинні контакти за допомогою хеморецепторного «розпізнавання» клітинами один одного.

Афінність між лектином та його рецептором дуже сильно може змінюватись в залежності від невеликих змін у вуглеводневій структурі рецептора. Усі ці властивості – є унікальними для лектинів та дозволяють досліднику розрізняти структури, вивчати один процес серед багатьох або виділяти один тип глікокон'югатів, клітин або вірусів із суміші. Усі живі організми можуть бути досліджені за допомогою лектинів, оскільки біомембрани та клітинні стінки живих організмів у своєму складі містять глікокон'югати,

Властивість лектинів до специфічного і вибіркового зв'язування лише з певними залишками вуглеводами з високою чутливістю відкриває перспективи застосування лектинів у галузі фармацевтичних наук. Завдяки своїй здатності зв'язувати цукри та їх залишки, вони мають широкий спектр дії на різні мембрани, оболонки клітин та інші тваринні і рослинні структури, внаслідок чого широко використовуються в біотехнології, медицині, цитології і імунохімії [25]

Ще одним напрямком використання лектинів в медицині є гемосорбція. Оскільки усі білки крові людини, крім альбуміну, є глікопротеїнами, для зв'язування аномальної вуглеводної частини білків крові використовують лектини при різних захворюваннях. У такому випадку перевагу віддають лектинам без токсичною частини, наприклад, лектинам насіння сої.



У біологічних дослідженнях у якості засобів для очищення мембран, віріонів, органел і клітин застосовують лектини. В основі такого процесу лежить спорідненість їх до мембраннозв'язаних глікокон'югатів. На сорбентах з лектину можна зв'язати надмолекулярні білкові ансамблі, у тому числі поліфункціональні системи ферментів.

В останні роки з'являється все більше робіт про використання лектинів для лікування та діагностики раку. Протипухлинна дія лектинів може здійснюватись через різні механізми: аутофагія, апоптоз, інгібування росту пухлини, тощо. На прикладі рицину було показано як лектини можуть цілеспрямовано зв'язуватись і викликати загибель клітин. Рицин може селективно здійснювати цитотоксичну активність *in vitro* по відношенню до SW480 (рак товстої кишки) та клітин K562 (лейкоз). Також показано, що здатен рицин індукувати апоптоз через активацію каспази 3 та фрагментацію ДНК [28, 29].

Лектини все більш широко застосовуються у медицині для діагностики виразок різної природи і пухлин у сечовому міхурі, ротовій порожнині, щитовидній залозі, молочних залозах, а також для дослідження чутливості клітин до дії радіації; для розпізнавання нормальних клітин від клітин аденоми та карциноми передміхурової залози [31].

Особливе значення віддіграють лектини в ролі носіїв. Найбільший інтерес виявляють кон'югати лектинів з ферментами, антибіотиками, антитілами, іншими лікарськими препаратами. Такі кон'югати можна вважати біфункціональними лектинами штучного походження. Схожі кон'югати застосовують в якості протиракових засобів.

На сьогоднішній день найбільш вивченим з точки зору імуномодельюючих та протипухлинних ефектів є лектин омели І типу. Цей лектин проявляє виражений антипроліферативний ефект шляхом індукування апоптозу по відношенню до різних пухлинних клітин: лейкемії, меланоми, раку молочної залози, раку легені, раку печінки. [30].

Рослинні лектини також можуть активувати синтез інтерферону (ІФН) у організмі таврин та людини, шляхом стимулювання секреції ІФН клітинами імунної системи *in vivo* та *in vitro*. Зокрема, лектини омели при інкубуванні з Т-лімфоцитами активували синтез ІФН цими клітинами. Вважають, що під впливом лектинів синтез ІФН здійснює стимулюючу дію цитотоксичної активності природних кілерів.

Аналогічний ефект був отриманий при додаванні до культури мононуклеарних клітин периферичної крові людини лектину омели. Лектини рослини *Arbus precatorius* [45] здатні виявляти стимулюючий ефект на продукування ІФН клітинами імунної системи у процесі пухлинного росту у мишей з лімфомою Дальтона.

У роботі [46] показано узагальнені дані щодо результатів доклінічного і клінічного застосуванні омели при раку молочної залози. Показано, що лектини омели здатні індукувати смерть пухлинн шляхом апоптозу через активацію каспаз 3, 8 і 9, індукуючи пониження регуляції білку Bcl-2 та інгібуючи активність теломерази.

Показано цитотоксичні властивості по відношенню до пухлинних клітин також такого відомого лектину або фітогемаглютиніну (ФГА). квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris*. Він широко відомий як мітоген. Вперше його мітогенна активність була описана на початку 60-х років. Як і всі лектини він володіє також аглютинуючою активністю. Фітогемаглютинін має цікаву вуглеводну специфічність.

Лейкоцитарний ізолектин фітогемаглютинін, на відміну від еритроцитарного, може розпізнавати триантенні і тетраантенні  $\beta$ -1-6-N-ацетилглюкозамінні залишки N-гліканів, при підвищенні експресії яких на поверхні деяких злоякісних пухлинних клітиннах свідчить про метастазування і прогресію пухлини. Ця властивість дозволила припустити, що він може бути достатньо перспективним для потенційного використання в онкології,

наприклад, в якості специфічного активатора апоптозу або специфічного поверхневого маркеру.

Враховуючи те, що ФГА квасолі звичайної характеризується низькою токсичністю і широким спектром біологічної активності, лектин використовують у дослідженнях не тільки як речовину із мітогенною по відношенню до клітин імунітету активністю, а і як засіб для вивчення процесів апоптозу. Таким чином була показана здатність еритроцитарного ізолектину квасолі червоної індукувати апоптоз у клітинах раку легені людини [48].

Лектини, отримані з різних видів і родів грибів, також показують значну антипроліферативну активність *in vitro* та *in vivo* [48]. Так, лектини *Agaricus bisporus* – антигензв'язувальний лектин, *Thomsen-Friedenreich* є зворотнім нецитотоксичним інгібітором проліферації епітеліальних клітин. При додаванні останнього до клітин колоректальної аденокарциноми людини (HT29) було видно виразне інгібування (до 87%) інкорпорації [3H]-тимідину, що безпосередньо корелюється із інгібуванням проліферації цих клітин. Лектин *Agaricus bisporus* здатний інгібувати на 50% проліферацію клітин MCF-7.

Схожі ефекти інгібування проліферації пухлинних клітин ліній MCF-7 і HepG2 було показано для лектину *Russula lepida*, О-нітрофеніл-P-D-галактопіранозидзв'язуючого лектину та інулін [49]. Показано, що лектин *Agrocybe aegerita*, який зветься антигензв'язний лектин *Thomsen-Friedenreich*, може *in vitro* інгібувати проліферацію пухлинних клітин різних ліній, наприклад, клітини раку шлунка (SGC-7901, MGC80-3, BGC-823), SW480, HeLa, саркоми миші S-180 та гострої промієлоцитарної лейкемії (HL-60), а також гальмувати *in vivo* у мишей BALB/c ріст пухлин S-180 [50]. Протипухлинна активність цього лектину реалізується в основному через апоптоз і активацію ДНКаз.

Щорічно з'являються дослідження про застосування лектинів у онкології з метою модуляції імунної відповіді. Тому слід підкреслити значення галектинів. Було показано, що галектин-2 може використовуватись для

лікування запальних процесів, що здійснюються активованими CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитами [51]. Як відомо – імунна відповідь пов'язана з присутністю (1,3)-галактози (Gal) у клітинах. Це пояснює активність вакцин на основі лектину у хворих на меланому, оскільки клітини якої містять галактозу.

Для лікування пацієнтів з меланомою, вакцини, як правило, покращують за допомогою галектинів. Запропоновано було концепцію створення протипухлинних вакцин, що ґрунтується на урахуванні особливостей глікозилювання клітин меланоми. Під час використання таких вакцин застосовуються вже існуючі антитіла до пухлинних антигенів; активація комплементу призводить до накопичення і дозрівання клітин, що мають антигени, в склад яких входить галактоза; що призводить до посилення фагоцитозу, що опосередкований Fc-рецептором [52].

В загальному, лектини різного походження вже досить активно використовуються не тільки у дослідженнях, а також і в лікуванні хворих на пухлини різної локалізації. Для створення протипухлинних вакцин застосовуються лектини і аглютинін зародків *Griffonia simplicifolia* пшениці, які є посередниками апоптозу у пухлинних клітинах [53]. Для імунотерапії хворих на аденокарциному молочної залози використовують інтерлейкін-2, дія якого оптимізується введенням лектину омели [54]. Блокування галектином-9 рецепторів лімфоцитів покращує клінічну ефективність імунотерапії хворих на рак носоглотки [55]. Було виділено лектиноподібний рецептор CLEC-1 С-типу, який є новим терапевтичним засібом для модуляції імунної відповіді при аутоімунних захворюваннях, трансплантації або раку [56].

Властивість лектинів зв'язувати специфічні вуглеводи пояснює їх використання у якості засобів для диференційної діагностики злоякісних та доброякісних захворювань, прогнозування інвазивності пухлин, ефективності лікування хірургічними і терапевтичними методами. Порушення глікозилювання клітинної мембрани також впливає на склад і характер розподілу рецепторів до лектинів.

Вуглеводні залишки на поверхні злоякісно трансформованих клітин більш сіалізовані і менш сульфатовані, вкочені та часто містять Т-антиген (Tantigen, Thomsen-Friedenreich antigen) та Tn антигени у їх сіалізованій формі в порівнянні з нормальними клітинами. У численних роботах показано, що такі антигени є пухлинно асоційованими та мають діагностичне і прогностичне значення під час виявлення пухлин [57-59] Зміни у сіалюванні термінальних (кінцевих) вуглеводних молекулах глікопротеїнів клітинних мембран можуть визначати інвазивність пухлини.

При пухлинному процесі помітили тенденцію до втрати дисахариду N-ацетілнейрамінової кислоти N-ацетилглюкозамін (NAcNeu-NAcGlc) – що є рецепторами до лектинів проростків пшениці (WGA +) і збільшення на мембранах злоякісних клітин різного походження рецепторів до лектинів сої (SBA +), арахісу (PNA +) і сочевиці (LCL +), що зв'язують відповідно N-ацетілгалактозамін, D-галактозу, D-манозу. У дослідженнях [60] було показано, що на клітинах гліоми різного ступеня анаплазії експресуються рецептори до великої кількості лектинів. Пропорційно підвищенню ступеня анаплазії пухлин мозку підвищується кількість клітин гліом з рецепторами до D-манози, а саме лектинів сочевиці (LCL).

Таким чином, проаналізувавши та врахувавши наведені вище літературні дані, можна зазначити, що використання лектинів у якості засобів імунотерапії раку може бути перспективним і потребує подальшого дослідження.

## 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Матеріали досліджень

Представлені у роботі дані одержано на експериментальному матеріалі.

#### 2.1.1 Штам мікроорганізму

В якості продуцента препаратів було використано бактерії роду *Bacillus*: спороутворюючі грампозитивні сапрофітні бактерії (рис. 4).

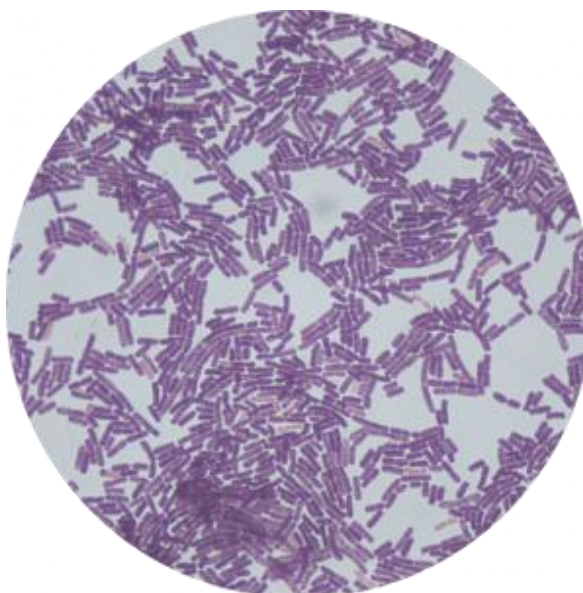


Рисунок 4 – *Bacillus subtilis* IMB B-7724.

Штам *B. subtilis* IMB B-7724 одержаний методом аналітичної селекції з штаму *B. subtilis* АБ-56, виділений Д.Г. Затулою, і задепонований у колекції Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (Київ, Україна) [61.].

#### 2.1.2 Умови культивування

Для культивування мікроорганізмів використовували оптимізоване для синтезу лектинів напівсинтетичне середовище Гаузе: бульйон Хоттінгера – 30 мл; пептон – 5,0 г; NaCl – 5,0 г; галактоза – 10,0 г, вода дистильована – 1 л, рН – 6,8-7,0.

Вирощування бактерій здійснювали протягом 9 діб при 37<sup>0</sup>С глибинним способом за різних умов аерації: на качалках (швидкість струшування 160 об/хв) – достатня аерація; в термостаті (перемішування 2 рази на добу) – умови глибокого лімітування за киснем.

### **2.1.3 Біологічно активні препарати, що містять продукти мікробного синтезу**

#### **2.1.3.1 Фільтрат культуральної рідини (ФКР) *B. subtilis* 7724**

Проби культуральної рідини (КР) відбирали кожні 24 год. протягом всього терміну культивування. Бактеріальні клітини відокремлювали центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 30 хв. Для подальшого дослідження використовували надосадову рідину. Контроль чистоти центрифугату КР (ЦФ КР) здійснювали мікроскопічно. Використовували для одержання досліджуваного лектину.

#### **2.1.3.2 Лектин**

Отримували за методи із культуральної рідини *B. subtilis* В-7724 за умов культивування в термостаті – на 8-му добу; культивування на качалках – на 4-ту добу [62]. Отримана речовина підлягала ліофілізації в діапазоні температур від -32 до +24<sup>0</sup>С. Готовий лектин у вигляді порошку зберігали при -20<sup>0</sup>С.

#### **2.1.4 Клітинні лінії**

Для дослідження цитотоксичної активності лектину використовували клітини раку Ерліха – асцитний варіант недиференційованої пухлини молочної залози. Використані як первинні пухлинні клітини, отримані безпосередньо з пухлини мишей лінії Balb/C.

#### **2.1.5 Експериментальна модель пухлинного росту**

В якості клітин-мішеней для визначення цитотоксичного впливу лектину використовували клітини раку Ерліха (асцитний варіант недиференційованої пухлини молочної залози), отримані з асцитної рідини мишей Balb/C на 10 добу пухлинного процесу. Для індукції асцитної форми раку використовували пухлинні клітини, отримані з Національного банку тканин людини і тварин

ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Протягом експерименту штам підтримували пасажами на мишах лінії Balb/C.

### **2.1.6 Експериментальні тварини**

Для отримання клітин асцитної форми раку Ерліха використовували мишей лінії Balb/C (рисунок 5) (самки віком 2,0-2,5 міс, вагою 20-23 г), які були одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України (ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України). Утримання тварин та роботу з ними здійснювали у відповідності до міжнародних загальноприйнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами [63].



Рисунок 5 – лінія мишей Balb/C

Balb/C це альбіносна, імунодефіцитна інбредна лінія. Миші характеризуються легкістю розведення і мінімальною різницею вагою між самками та самцями. Випадку утворення пухлин молочних залоз у данної лінії дуже рідкісні, проте вони чутливі до канцерогенів і пухлини легень, ретикулярні новоутворення пухлини нирок часто зустрічаються у мишей.



## **2.2 Методи досліджень**

### **2.2.1 Отримання суспензії пухлинних клітин асцитного раку Ерліха**

Штам пухлини підтримувався протягом всього терміну експерименту. На 10 добу після перещеплення пухлинних клітин в черевну порожнину мишей з асцитною формою раку вводили 2 мл стерильного фізіологічного розчину. Проводили масаж передньої стінки черевної порожнини. Після чого асцитну рідину відбирали за допомогою шприца. Пухлинні клітини відмивали центрифугуванням в стерильному 0,9% розчині NaCl. Проводили підрахунок кількості клітин в камері Горяєва і доводили концентрацію до  $1 \times 10^6$  клітин в 1мл.

### **2.2.2 Визначення гемаглютинуючої активності**

Гемаглютинуючу активність (ГАА) оцінювали за допомогою реакції гемаглютинації (РГА) з використанням 2% суспензії оброблених трипсином і фіксованих глутаровим альдегідом еритроцитів кроля методом двократних серійних розведень в полістирольних мікропланшетах з U-подібними лунками при кімнатній температурі [64]. ГАА визначали як останнє розведення, при якому спостерігається РГА, і виражали як титр<sup>-1</sup> РГА. В якості контролю аутоаглютинації еритроцитів використовували 2% суспензію еритроцитів у забуференому фізіологічному розчині за відсутності ЦФ КР.

### **2.2.3 Визначення цитотоксичної активності (МТТ-тест) по відношенню до пухлинних клітин [65]**

Суспензію ПК (всі серії досліджень) висаджували на 96-лункові планшети в концентрації  $1 \times 10^5$  кл/на лунку в 100 мкл повного ростового середовища. Через 24 год у відповідні лунки вносили досліджувану речовину в різних концентраціях (0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 мг/мл) та інкубували клітини за стандартних умов протягом 30, 60 та 120 хв. В якості контролю використовували лунки з клітинами, в які не додавали досліджуваний препарат. Всі проби ставили в 3-х паралелях. Після завершення відповідного терміну

інкубації планшети двічі відмивали 0,9% NaCl та додавали 200 мкл повного середовища RPMI-1640 (або DMEM) і 20 мкл розчину MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (SIGMA, США) в концентрації 5 мг/мл. Інкубували 4 год за стандартних умов, двічі відмивали фізіологічним розчином та додавали 140 мкл 50% розчину ДМСО (диметилсульфоксид; SERVA). Оптичну густину (ОГ) вимірювали при  $\lambda=540$  нм на автоматичному *microELISA reader*. Індекс цитотоксичності (ІЦ) розраховували за формулою:

$$\text{ІЦ} = (1 - (\text{ОГ}_{\text{ПК+ЛЕКТИН}} - \text{ОГ}_{\text{ПК}}) / \text{ОГ}_{\text{ПК}}) \times 100\%$$

де:  $\text{ОГ}_{\text{ПК+ЛЕКТИН}}$  – оптична густина в лунках з ПК та лектином;

$\text{ОГ}_{\text{ПК}}$  – оптична густина в лунках з ПК без додавання лектину

#### 2.2.4 Визначення цитолітичної активності

Для визначення цитолітичної активності планшети з ПК ( $1 \times 10^5$  клітин/на лунку в 100 мкл повного ростового середовища) та ЦФ КР інкубували протягом 1 год при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$ , після чого проводили підрахунок загальної кількості клітин в камері Горяєва за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім [64], та обраховували % лізованих клітин. В камері Горяєва підраховували кількість живих та мертвих клітин на 100 клітин в полі зору. Після фарбування трипановим синім мертві клітини набувають синього кольору, живі залишаються прозорими. Кількість живих/мертвих клітин виражали у відсотках (%).

Камера Горяєва (рис. 6) представляє собою товсту скляну пластинку (предметне скло) з жолобком в центрі. На дні камери нанесено чотири сітки Горяєва, розмежовані поперечним рівчачком, до яких притирається шліфоване покривне скло. Кожна сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів, 25 з яких розділені на 16 малих квадратів кожен.

Сторона великого квадрату становить 0,2 мм, а малого – 0,05 мм. Перед заповненням суспензією клітин камеру Горяєва і покривне скло ретельно протирають і висушують. Покривне скло щільно притискають до бічних пластин камери, злегка пересувають його вгору і вниз, доки не з'являться райдужні смуги («кільця Ньютона»). Піпеткою набирають невеликий об'єм суспензії клітин та підносять краплину до краю покривного скельця, щоб суспензія заповнила рівномірно всю поверхню камери з сіткою не затікаючи в бічні борозни.

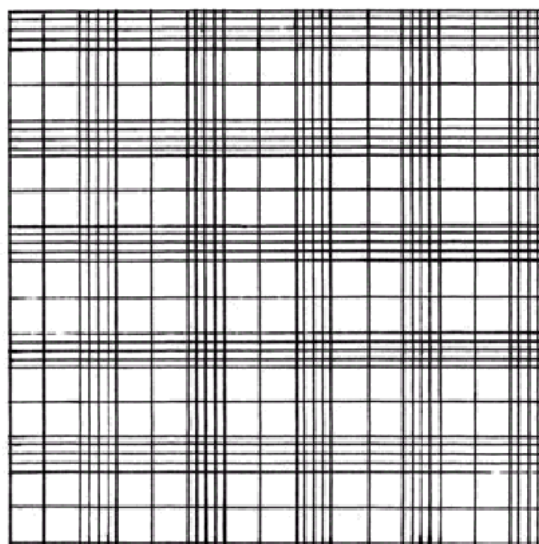


Рисунок 6 – Зображення квадратів сітки камери Горяєва .

Кількість млн.клітин/мл суспензії = N клітин в одному великому квадраті

\*4

### 2.2.7 Визначення молекулярної маси лектину

Молекулярну масу лектину визначали методом електрофорезу [66.]. Білки розділяли в 10,0% DDC-поліакриламідному гелі. Електрофорез проводили у вертикальних пластинах за постійного струму ( $U = 100$  В). Електрофореграми забарвлювали розчином, який містив 0,4% Кумасі (Ferak, Німеччина), 45% етанол і 10% оцтової кислоти. Оцінку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення *TotalLab 1.10*. Для визначення молекулярної маси в

якості контролю використовували набір стандартних маркерів білків відомої маси (Sigma, США).

### **2.2.8 Визначення вмісту амінокислот**

Вміст амінокислот визначали на амінокислотному аналізаторі T339 (Чехія) в режимі гідролізатів за методом [67.] з використанням стандартів (Sigma, США). Оптичну щільність продукту реакції, яка кількісно прямо пропорційна концентрації речовини в розчині, виміряли при довжині хвилі 520 нм. Визначали вміст амінокислот в розрахунку на 100 мг зразка.

### **2.2.9 Визначення амінокислотного складу**

Аналіз білків та пептидів потребує попереднього гідролізу зразків з метою руйнування пептидних зв'язків. Стійкість пептидних зв'язків по відношенню до гідролізу залежить від роду амінокислоти і структури білку. Амінокислоти, які виділяють із пептидних зв'язків, можуть в результаті розкладання змінюватися під дією гідролізуючого реактиву або інших компонентів реакційної суміші. Тому неможливо отримати абсолютні дані про вміст амінокислот при однакових умовах гідролізу.

Для повноти інформації проводять гідроліз при різних температурах і часі утримання, а для визначення триптофану проводять гідроліз гідроокисом барію. Якщо перед гідролізом зразок не звільнюється від вільних амінокислот, то отримують дані про сумарний вміст амінокислот (вільних і зв'язаних) в зразку. Аналіз складу білкових амінокислот проводили на амінокислотному аналізаторі T 339, (Чехія, Прага) у режимі гідролізатів. Гідроліз білків проводили хлористоводневою кислотою за методом [147]. Це засіб гідролізу, який найчастіше застосовується. Його проводять із застосуванням 6н HCl, отриману розведенням концентрованої кислоти дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Гідроліз проводять в спеціальних пробірках з герметичними пробками. 50 мг зразка вносять на дно пробірки так, щоб матеріал не залишався на її стінках. У пробірку додають 3 мл 6н HCl.

Пробірку ретельно загвинчують пробкою із тефлоновою прокладкою та вносять у блок гідролізації і залишають протягом 24 год. По закінченні гідролізу пробірки охолоджують. Вміст пробірки під тягою фільтрують в колбу із шліфом. Кислота випаровується у вакуумному роторному випарювачі при 400°C. Сухий залишок розчиняють в необхідному об'ємі дозацийного буферу та аналізують. Зразки, які після гідролізу не аналізують, залишають закритими і поміщають у холодильник або морозильну камеру.

Аналізатор працює в режимі гідролізатів. На аналітичну колонку подається 100 мкл зразка. Для елюції готують три натрієвих буферних розчини. Оптична щільність продукту реакції, яка кількісно прямопропорційна концентрації речовини в розчині, визначається при 520 нм.

#### **2.2.10 Визначення вуглеводної специфічності**

Вуглеводну специфічність визначали методом інгібування гемаглютинуючої активності після взаємодії лектину з рядом цукрів: Д-галактозаміном, лактозою, Д-глюкозою, Д-глюкозаміном, фруктозо-1,6-дифосфатом, Д-глюкуроновою кислотою, N-ацетілнейраміновою кислотою, N-гліколілнейраміновою кислотою (Sigma, США). Реакцію проводили у 96-лункових U-подібних планшетах, використовуючи 2% завись нативних еритроцитів кроля [68.].

#### **2.2.11 Визначення рН-стабільності лектину**

Визначення рН-стабільності проводили за результатами гемаглютинуючої активності лектину (концентрація 1 мг/мл), який попередньо піддавали діалізу (24 год, 20°C) в різних буферних розчинах в діапазоні значень рН від 6,0 до 9,0. Використовували наступні буферні розчини: 20 мМ ацетатний буфер (рН 6,0), 20 мМ фосфатний буфер (рН 6,5; 7,0), 20 мМ Трис-НСІ буфер (рН 7,5; 8,0; 8,5; 9,0). [69]

### **2.2.12 Визначення температурної стабільності лектину**

Температурну стабільність оцінювали за результатами гемаглютинуючої та цитотоксичної активності лектину (концентрація 1 мг/мл) після його інкубації протягом 1 год в діапазоні температур від 20 до 90°C (з кроком 10°C) [70].

### **2.2.13 Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів проводили за загально прийнятими методами варіаційної статистики [71]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за  $t$ –критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при  $p < 0,05$ . Розрахунки та побудову графіків виконували з використанням прикладної програми *OriginLab*.

## 2.3 Результати та їх обговорення

### 2.3.1 Біологічна активність позаклітинних метаболітів, присутніх в середовищі росту *B. subtilis* IMB B-7724

Характерною властивістю, яка свідчить про приналежність речовини до класу лектинів є здатність до аглютинації клітин завдяки специфічному зв'язуванню з вуглеводними детермінантами на їх поверхні. Тому першим етапом дослідження було вивчення ГАА зразків ЦФ КР, отриманих на різні доби росту *B. subtilis* IMB B-7724 (рис. 7).

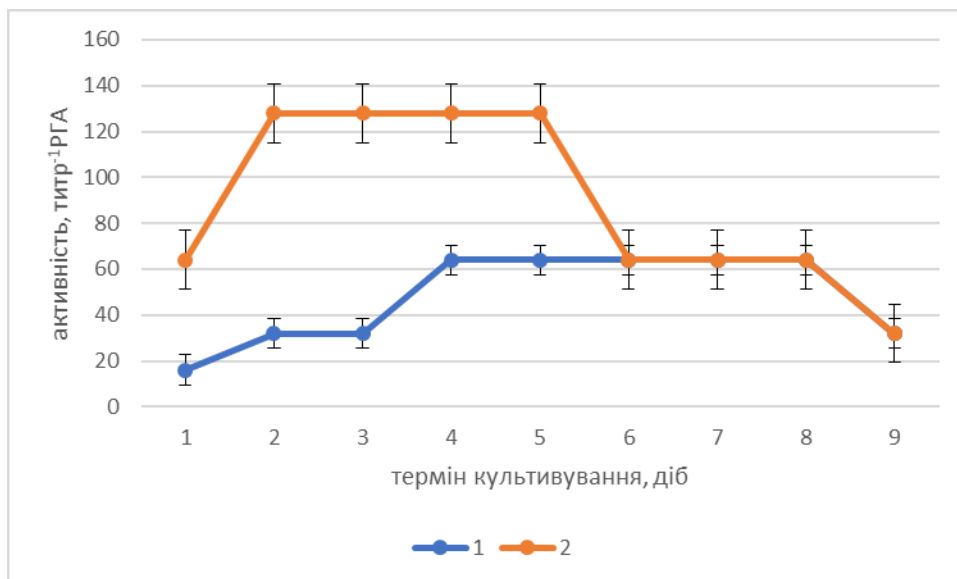


Рисунок 7 – Гемаглютинуюча активність центрифугату культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724 при культивуванні у термостаті (1) та на качалках (2)

Як видно з рисунку, в культуральній рідині *B. subtilis* IMB B-7724 присутня речовина, яка володіє суттєвою гемаглютинуючою активністю (ГАА). Але динаміка накопичення такої лектиноподібної речовини значною мірою залежала від умов аерації. Так, в умовах культивування у термостаті активність ЦФ КР поступово зростала, досягаючи на 4-ту добу значення 64 титр<sup>-1</sup>РГА і залишаючись на цьому рівні до 8-ї доби росту. При культивуванні на качалках накопичення в КР (культуральної рідини) активної речовини відбувалося в більш ранні терміни – вже на 2-гу добу росту культури показник ГАА зростав

до 128 титр<sup>-1</sup>РГА. Його зниження відмічали на 6-ту добу (64 титр<sup>-1</sup>РГА). Починаючи з 6-ї доби показники ГАА були однаковими для зразків ЦФ КР, отриманих при культивуванні мікроорганізмів як за умов недостатньої аерації, так і при достатньому забезпеченні киснем.

### 2.3.2 Дослідження *in vitro* цитотоксичної та цитолітичної активності ЦФ КР *B. subtilis* IMB B-7724 по відношенню до клітин раку Ерліха

Враховуючи відомості про протипухлинну активність позаклітинних лектинів штаму *B. subtilis* IMB B-7025 [72] наступним етапом нашого дослідження було визначення *in vitro* цитотоксичної та цитолітичної активності ЦФ КР *B. subtilis* IMB B-7724 по відношенню до клітин РЕ.

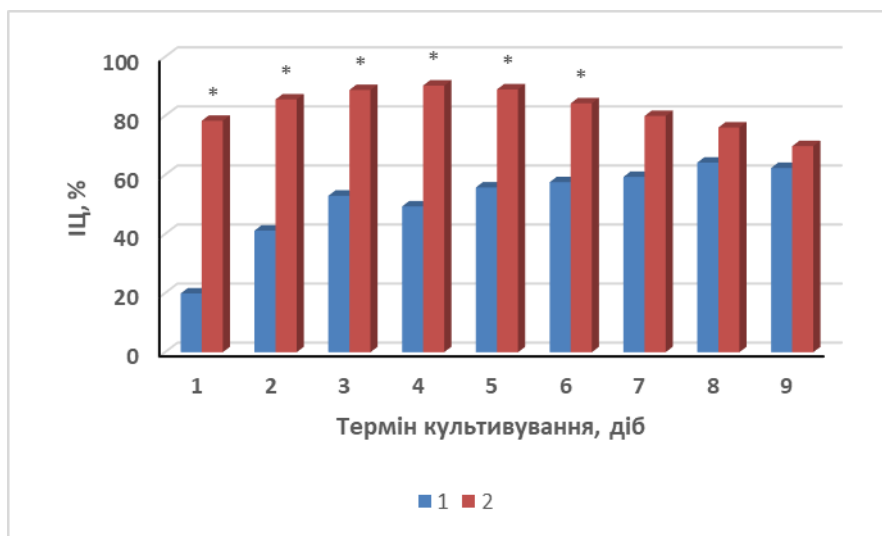
Результати дослідження показали, що незалежно від умов аерації в КР *B. subtilis* IMB B-7724 присутні речовини, які викликають загибель значної частини ПК протягом 1 год. Але рівень цитотоксичної активності і динаміка її наростання суттєво відрізнялися протягом перших 7 діб культивування. При вирощуванні на качалках вже з 1-ї доби відмічали суттєве підвищення цитотоксичної активності ЦФ КР (ІЦ = 78,4%). Протягом перших 6 діб значення цього показника коливалися в межах 78,4–90,3%, в подальшому відбувалося його поступове зниження до 69,8% (рис. 7А). Максимальну цитотоксичну активність спостерігали на 4-ту добу росту (ІЦ = 90,3%).

Цитотоксична активність ЦФ КР, отриманого при вирощуванні *B. subtilis* IMB B-7724 у термостаті протягом перших 6 діб була суттєво меншою ( $p < 0,05$ ), порівняно з аналогічними показниками для ЦФ КР, отриманої при культивуванні на качалках. Найбільшу цитотоксичну дію на ПК відмічали на 8-му добу росту (ІЦ = 62,3%) (див рис. 8А).

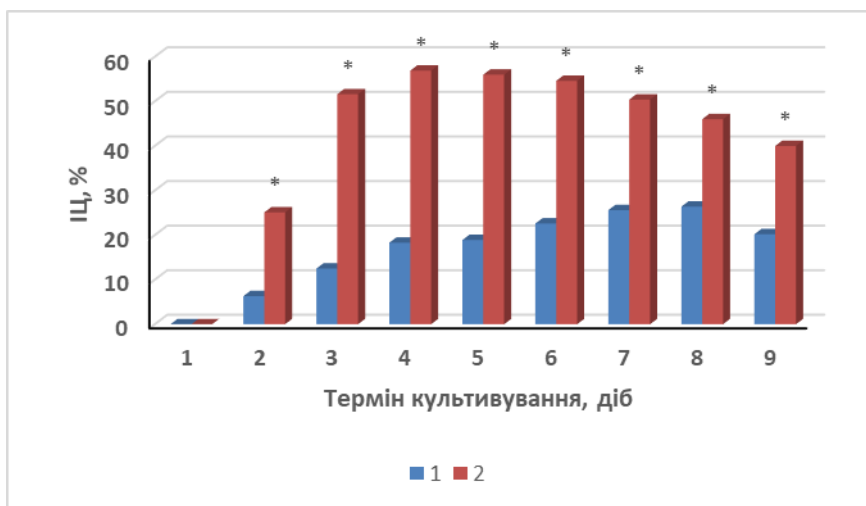
Розведення зразків ЦФ КР в співвідношенні 1:2 практично не впливало на динаміку змін цитотоксичної активності: максимальні значення показників відмічені на 4-у добу росту мікроорганізмів (ІЦ = 56,9%) за умов достатньої аерації та на 8-му добу – за умов глибокого лімітування за киснем (ІЦ = 26,4%) (рис. 8Б).



Збільшення терміну впливу ЦФ КР на клітини РЕ до 2 год. не призводило до суттєвих змін показників цитотоксичної активності: максимальну активність відмічали на 4-у добу росту при культивуванні на качалках ( $IC_{\text{цільний}} = 97,4\%$ ;  $IC_{\text{розв 1:2}} = 87,7\%$ ) та на 8-у добу при вирощуванні за умов недостатньої аерації ( $IC_{\text{цільний}} = 75,0\%$ ;  $IC_{\text{розв 1:2}} = 39,2\%$ ) (рис. 9).



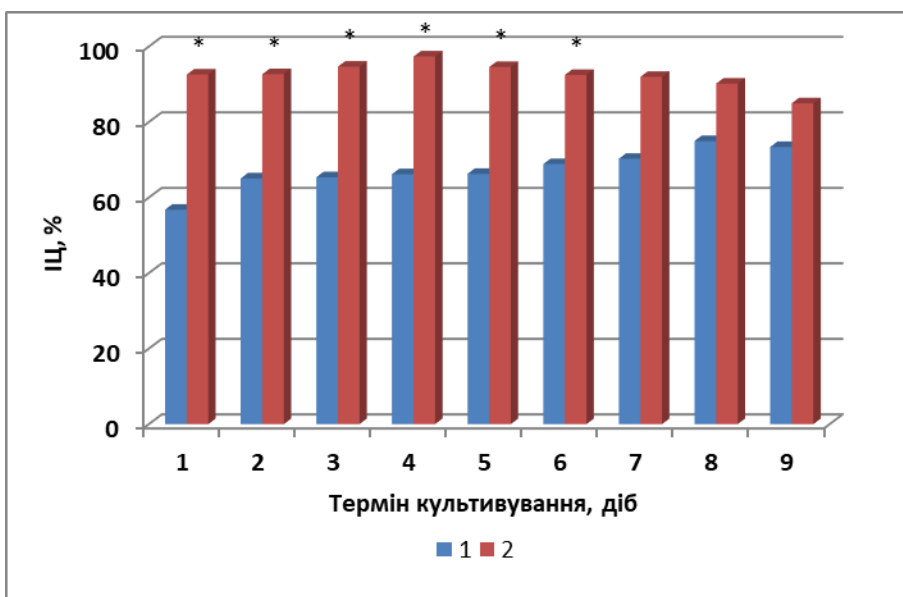
А



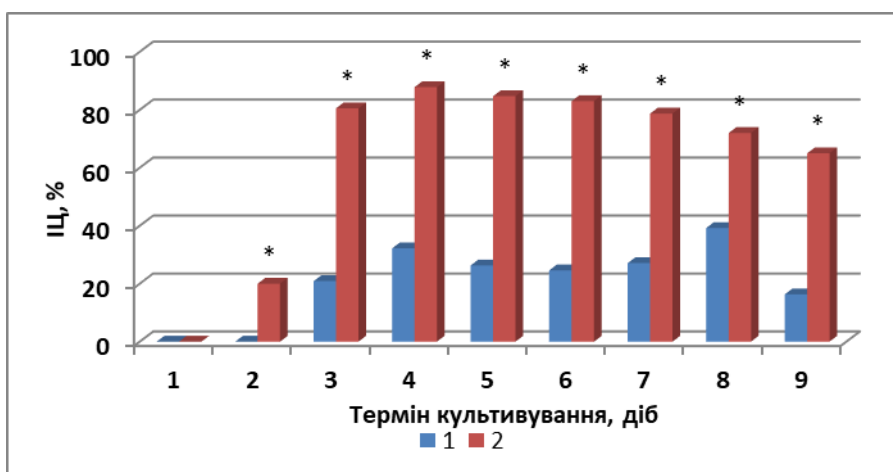
Б

Рисунок 8 – Цитотоксичний вплив на ПК протягом 1 год. при культивуванні *B. subtilis* IMB B-7724 у термостаті (1) та на качалках (2)

Примітки: А – нерозведений ЦФ КР, Б – розведення 1:2; \*  $p < 0,05$  при порівнянні показників на відповідні доби росту



А



Б

Рисунок 9 – Цитотоксичний вплив на ПК протягом 2 год. при культивуванні *B. subtilis* IMB B-7724 у термостаті (1) та на качалках (2)

Примітки: А – нерозведений ЦФ КР, Б – розведення 1:2; \*  $p < 0,05$  при порівнянні показників на відповідні доби росту

Потрібно відмітити, що ЦФ КР *B. subtilis* IMB B-7724 крім цитотоксичного виявляв і цитолітичний вплив на пухлинні клітини (табл. 2.1). Інкубація ПК протягом 1 год з цільним ЦФ КР мікроорганізму, який культивували на качалках, призводила до лізису практично всіх клітин. Наслідком культивування *B. subtilis* B-7724 в умовах глибокого лімітування за

киснем було накопичення в КР значно меншої кількості речовин з цитолітичною дією. Розведення ЦФ дещо зменшувало його цитолітичну активність, але на загальну динаміку змін показників не впливало (див. табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Цитолітична активність ЦФ КР *B. subtilis* B-7724 по відношенню до клітин РЕ (кількість лізованих клітин, %)

Доба росту	Культивування					
	На качалках			на качалках		
	цільна	1:2	1:4	цільна	1:2	1:4
1	63,6±0,6	35,0±0	4,9±0,3	92,0±1,9	56,7±0,5	7,5±1,8
2	72,5±0,4*	36,4,0±0,9*	13,0±0,6*	100,0±0,0	100,0±2,9	35,5±2,4
3	77,0±0,3*	39,0±2,1*	18,5±0,7*	100,0±0,0	99,0±3,6	46,5±1,1
4	76,9±1,8*	37,0±1,8*	13,5±2,4*	100,0±0,0	100,0±2,0	30,1±1,8
5	70,1±0,5*	29,0±4,9*	13,0±0,5*	100,0±0,0	81,0±3,2	29,5±3,1
6	67,0±0,3*	24,0±11,7*	14,1±1,4*	100,0±0,0	76,5±1,5	39,5±2,0
7	55,5±0,3*	10,0±5,2*	2,1±1,3*	94,0±3,5	64,2±3,7	48,2±0,5
8	50,0±2,9*	5,6±1,8*	2,0±0,3*	80,0±3,7	50,0±2,0	30,9±3,9
9	48,9±2,6*	5,3±0,6*	2,0±0,3*	80,0±3,7	50,0±2,0	30,9±3,9

Примітки: \*  $p < 0,05$  порівняно з аналогічними показниками при культивуванні на качалках

Таким чином, отримані на даному етапі дослідження результати свідчать про те, що присутня в КР мікроорганізму *B. subtilis* IMB B-7724 лектиноподібна речовина здійснює суттєвий цитотоксичний та цитолітичний вплив на клітини РЕ, що дає можливість говорити про її протипухлинні властивості.

На сьогодні, зокрема, продемонстрована цитотоксична (щодо трансформованих клітин різного походження) активність позаклітинних лектинів *B. subtilis* B-7025. Цю властивість було використано при розробці і створенні протипухлинних вакцин для імунотерапії онкологічних хворих [73]. Дослідники показали, що інкубація КР бактерій *B. subtilis* B-7025 з ПК призводила до аглютинації та подальшого лізису останніх.

При культивуванні в термостаті максимальну гемаглютинуючу та цитотоксичну активність виявляли в зразках КР, отриманої на 6–8-му доби росту культури. При визначення ГАА відмічали два максимуми: на 1–3-ю (32 титр<sup>-1</sup>РГА) та на 6–8-му доби (128 титр<sup>-1</sup>РГА), в подальшому відбувалося різке зниження цього показника. Аналогічні результати отримані при вивченні цитотоксичної активності по відношенню до клітин саркоми 37 та РЕ: максимальну загибель ПК спостерігали при інкубації з КР, отриманою на 7–8-му доби росту культури.

Таку динаміку автори пов'язують з двофазним циклом розвитку *B. subtilis* B-7025, при якому спочатку відбувається інтенсивне накопичення біомаси та незначна продукція біологічно активних речовин. В другій фазі розвитку культури зменшення кількості поживних речовин в середовищі обумовлює уповільнення накопичення біомаси та збагачення КР продуктами життєдіяльності мікроорганізмів. Саме ця фаза супроводжується максимальним накопиченням речовин з гемаглютинуючими і цитотоксичними властивостями. Це положення підтверджують результати дослідження динаміки синтезу екзогенних лектинів сульфатредуючими бактеріями *Thermodesulfobacterium mobile* ВКМ-1128. В якому показано, що процес синтезу активної речовини пов'язаний з молодими активними клітинами культури, оскільки пряма кореляція між наростанням біомаси і синтезом екзогенних лектинів спостерігалася тільки в період експоненціальної та на початку стаціонарної фази росту популяції [74.].

Результати наших досліджень показали, що динаміка накопичення біологічно-активних метаболітів в КР *B. subtilis* IMB B-7724 при культивуванні в умовах недостатньої аерації аналогічна описаній вище для *B. subtilis* B-7025. Максимальні показники ГАА відмічали з 4-ї по 8-му доби росту культури в термостаті. Найвища цитотоксична активність була характерна для ЦФ КР, отриманої на 8-му добу росту мікроорганізмів.

Посилення аерації середовища культивування призводило до скорочення терміну накопичення в КР біологічно-активних метаболітів. Так, при вирощуванні *B. subtilis* IMB B-7724 на качалках суттєве зростання ГАА відмічали вже на 2-гу, а цитотоксичної активності – на 4-ту добу культивування. При цьому максимальні значення показників активності були значно більшими: ГАА – в 2 рази, цитотоксична активність – в 1,4 та 1,3 разу (через 1 та 2 год., відповідно).

Було відмічено, що починаючи з 6-ї доби зникала суттєва різниця між показниками (при порівнянні на відповідні доби росту) гемаглютинуючої та цитотоксичної активності ЦФ КР, отриманої при вирощуванні мікроорганізмів за різних умов аерації. Вірогідно, зменшення накопичення лектиноподібної речовини у віддалені терміни росту культури обумовлено виснаженням культурального середовища та недостатністю необхідної кількості кисню та поживних речовин для подальшого росту.

Потрібно відмітити, що в наших дослідженнях ЦФ КР *B. subtilis* IMB B-77244 по відношенню до ПК виявляв крім цитотоксичної і цитолітичну активність. Остання, вірогідно, обумовлена здатністю бактерій продукувати крім лектиноподібних речовин і ферменти. Відомо, що мікроорганізми роду *Bacillus* синтезують низку речовин з ферментативною активністю, зокрема, протеолітичною [75] та фібринолітичною [76]. Тобто, в подальшому в процесі виділення з КР *B. subtilis* IMB B-7724 лектину необхідно враховувати, що даний мікроорганізм здатен продукувати також позаклітинні речовини з ферментативними властивостями.

Таким чином, позаклітинні метаболіти *B. subtilis* IMB B-7724 виявляють значну гемаглютинуючу та цитотоксичну активність, ступінь вираженості якої залежить від умов аерації культурального середовища. За умов достатньої аерації скорочується термін накопичення в КР біологічно-активних метаболітів та зростає їх активність: за показниками ГАА – в 2 рази, цитотоксичної активності – в 1,3–1,4 разу. З метою отримання цитотоксичного лектину з КР доцільно використовувати культивування *B. subtilis* IMB B-7724 на качалках. Виражена ГАА ЦФ КР свідчить про присутність речовин з властивостями лектинів.

Отримані на цьому етапі дослідження результати обґрунтовують доцільність подальшого виділення лектину з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724 на 4-ту добу (культивування на качалках).

### **2.3.3 Дослідження ряду фізико-хімічних та біологічних властивостей лектину, виділеного з культуральної рідини *B. subtilis* 7724**

Лектин, виділений з культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7724, зберігається у вигляді аморфного порошку бурого кольору. Добре розчиняється у воді, буферних розчинах (забуференому фізіологічному розчині, Трис-НCl).

#### **2.3.3.1 Амінокислотний склад лектину**

При проведенні електрофоретичного дослідження виявлено, що отриманий лектин більшою мірою складається з білків з молекулярною масою 18,0–20,0 кДа (рис. 10). Причому більш однорідна речовина отримана з культуральної рідини мікроорганізмів, ріст яких відбувався за умов достатньої аерації.

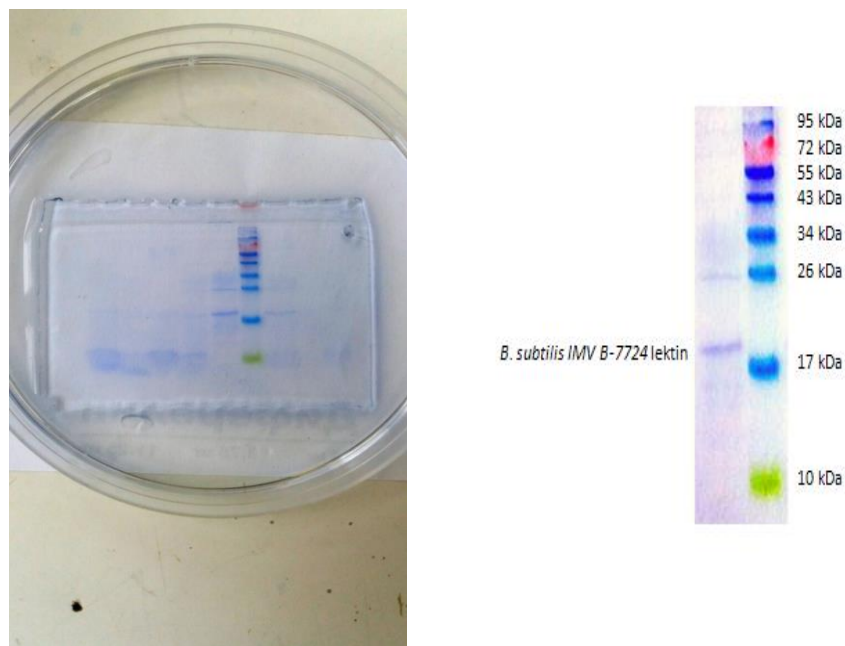


Рисунок 10 – Електрофореграма лектину *B. subtilis* IMV B-7724

За амінокислотним складом та кількісним вмістом амінокислот досліджувані лектини подібні до інших бактеріальних лектинів, ізольованих з різних джерел [77.]. Незалежно від режиму культивування в їхньому складі превалюють лейцин, аланін, фенілаланін, тирозин. Отримані лектини не містять пролсну. Вміст інших амінокислот коливається в середніх значеннях (рис. 11).

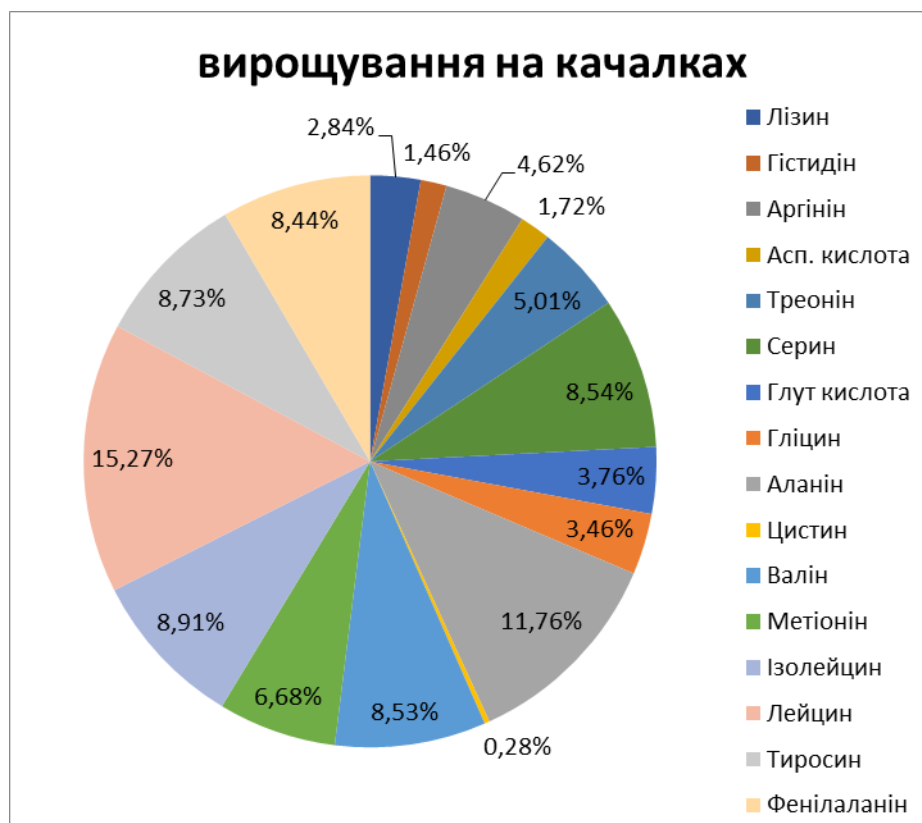


Рисунок 11 – Вміст вільних амінокислот в 100 мг лектину при виращування на качалках (% за масою в мг) (розрахунок на 100 мг зразка)

### 2.3.3.2 Дослідження вуглеводневої специфічності

Однією з основних характеристик лектинів виділених із різних організмів є їх специфічність до взаємодії з різними цукрами. Дана властивість надає лектинам унікальності і служить основою для їх класифікації. Визначення спорідненості отриманих нами позаклітинних бактеріальних лектинів до ряду цукрів показало, що найвищу спорідненість лектини бацил виявляли до муцину підщелепної залози бика, що містить найбільшу кількість двох типів сіалових кислот (N-ацетілнейрамінової та N-гліколілнейрамінової), Д-глюкуронової кислоти та фруктозо-1,6-дифосфату (табл. 2.2). Інгібуюча дія інших цукрів на процес аглютинації лектинів з еритроцитами кроля знаходилась на рівні неспецифічності.



Таблиця 2.2– Вуглеводна специфічність лектину *Bacillus subtilis* B-7724

Вуглеводи	Мінімальні інгібуючі РГА концентрації вуглеводів, мМ	
	культивування в термостаті	культивування на качалках
Д-галактозамін	0,0	0,0
Лактоза	37,5	37,5
Д-глюкоза	150,0	150,0
Д-глюкозамін	0,0	0,0
Фруктозо-1,6-дифосфат	18,7	18,7
Д-глюкуронова кислота	1,9	0,9
Н-ацетілнейрамінова кислота	0,6	0,3
Н-гліколілнейрамінова кислота	0,6	0,3

Таким чином, проведені нами дослідження щодо впливу різних вуглеводів на процес аглютинації лектинів з еритроцитами кроля підтвердили, що отриманий бактеріальний лектин належить до сіалоспецифічних, як і більшість позаклітинних лектинів різних штамів *Bacillus subtilis*. Ця властивість є важливою при дослідженні протипухлинної активності речовини, так як саме сіалові кислоти у значній кількості представлені на поверхні більшості пухлинних клітин. Як видно з результатів, представлених у таблиці 22, при рості на качалках мікроорганізми виділяють в культуральне середовище

речовину, яка володіє в 2 рази більшою спорідненістю до Д-глюкуронової кислоти (0,9 проти 1,9 мМ) та сіалових кислот (0,3 проти 0,6 мМ). Це дозволяє припустити, що отриманий лектин буде мати також більшу протипухлинну активність.

#### **2.3.3.3 Стабільність лектину до зміни температури та рН середовища**

Важливою характеристикою будь-якої речовини, що може бути використана в якості терапевтичного агента, є стабільність до впливу різних факторів зовнішнього середовища та здатність зберігати свої біологічні властивості протягом тривалого часу. Для оцінки згаданих характеристик були проведені дослідження стабільності біологічної активності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 (культивування за умов достатньої аерації) при зміні температур (від 20 до 90<sup>0</sup>С) та рН середовища (від 6,0 до 9,0). В даній серії досліджень використовували лектин в концентрації 1 мг/мл. Прогрівання зразків лектину протягом 1 год. при температурі від 20 до 90<sup>0</sup>С не призводило до втрати ні гемаглютинуючої (для всіх зразків – 1024 титр<sup>-1</sup> РГА), ні цитотоксичної активності (табл. 2.3).

Зміна рН середовища в діапазоні від 6,0 до 8,0 також суттєво не впливала на показники біологічної активності досліджуваної речовини. Гемаглютинуюча активність складала 1024 титр<sup>-1</sup> РГА при всіх значеннях рН. Цитотоксична активність усіх досліджених зразків суттєво не відрізнялась від контрольних показників (табл. 3). Тобто, отриманий нами лектин є термостабільним і стійким до зміни рН середовища.

Таблиця 2.3 – Стійкість лектину *B. subtilis* IMB B-7724 до зміни температури та рН середовища за показниками цитотоксичної активності по відношенню до пухлинних клітин

Зміна температурного режиму			Зміна рН середовища		
Темпе- ратура, °C	Щ, %	гемаглютинуюча, титр-1 РГА	рН	Щ, %	гемаглютинуюча, титр-1 РГА
20	97,4±0,3	1024	Контроль (NaCl)	97,6±0,9	1024
30	97,6±0,4	1024	6,0	96,2±0,6	1024
40	97,5±0,1	1024	6,5	96,4±0,5	1024
50	97,5±0,1	1024	7,0	96,5±1,4	1024
60	96,9±0,1	1024	7,5	97,0±0,5	1024
70	96,8±0,3	1024	8,0	96,8±0,4	1024
80	95,8±0,3	1024	8,5	95,9±1,1	1024
90	95,9±0,1	1024	9,0	95,0±1,0	1024

### 3 СТАРТАП ПРОЕКТ

**3.1 Резюме:** конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінностей

**Загальна характеристика розробки:**

**Тема:** Дослідження властивостей протипухлинної речовини, яка відділена з культуральної рідини *Bacillus Subtilis IMB B-7724*;

**Мета проекту:** Дослідити основні властивості протипухлинної речовини для впровадження в виробництво ін'єкційних препаратів;

**Суб'єкт замовлення:** НАНУ «Інститут експериментальної онкології, паталогії та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького»;

**Об'єкт дослідження:** лектин виділений з культуральної рідини *Bacillus Subtilis IMB B-7724* ;

**Місце розробки у інноваційному ланцюжку цінності:** ідея знаходиться на етапі розробки, оскільки проводиться дослідження основних властивостей, якими володіє лектин в Інституті експериментальної онкології, радіобіології та паталогії ім Р.Є. Кавецького

**Місце товару у міжнародній класифікації товарів:** клас 1, біологічні препарати для використання у промисловості та науці;

**Цінність:** підвищення ефективності лікування онкологічних хворих;

**Гранична корисність товару:** значне підвищення шляхів лікування онкологічних хворих.

Таблиця 3.1 – Резюме стартап-проекту

Показник	Характеристика
1. Сутність ідеї	Дослідження основних властивостей протипухлинної речовини для впровадження в виробництво ін'єкційних препаратів
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Відсутні
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Підвищення ефективності лікування онкологічних хворих
4. Ступінь розробленості технології реалізації	Лабораторне дослідження
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 1 – біологічні препарати
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	М 72.1 ( Дослідження та експериментальна розробка в природничих науках)
7. Очікувана потужність стартапу	Мале
8. За масштабом виробництва	Серійне
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
10. За ресурсами, що споживатимуться	Матеріаломістке, капіталомістке
11. За чисельністю персоналу	Мале
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
13. Бажане географічне розташування - потужностей стартапу; - офісу стартапу; - збутової мережі; - постачальників комплектуючих.	– потужностей : м. Київ; –офіс старатапу: м. Київ, метро Васильківська – збутова мережа : вся Україна – постачальники : найближчі області
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	Розробка
15. Гранична корисність ідеї стартапу	значне підвищення шляхів лікування онкологічних хворих
16. Бізнес-модель стартапу	B2B
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні	Немає

конкурентні переваги, фактори успіху)	
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Немає
19. Ключові фактори успіху стартапу	Підвищення ефективності лікування
20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	Інститут експериментальної онкології, паталогії та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, Міністерство охорони здоров'я
21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	Звіт з НДР
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	Звіт з НДР
23. Споживачі на етапі розвитку	Власне виробництво
24. Споживачі на етапі зрілості	Українські фармацевтичні підприємства
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	22,1%
27. Капіталовкладення в НДР	81871,66 грн
28. Джерела фінансування	Зовнішні, внутрішні, національні
29. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Лектин -100%
30. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	НАН України
31. Планове місце реалізації результату розробки (місце, планова доля реалізації продукту через це місце)	Інститут раку
32. Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Немає
33. Методи просування результатів розробки на ринок	Пропаганда, реклама

Терміни:

1.Продукт: Лектин –Білок не імунного походження.

2.Технологія: Вибір оптимального методу культивування мікроорганізму *Bac. Subtilis IMB B-7724* та проведення дослідження цитотоксичної активності за допомогою МТТ-тесту на прикладі аденокарценоми молочної залози та гемаглютинуючої активності культуральної рідини та готового лектину *Bac. Subtilis IMB B-7724*.

3.Кваліфікація персоналу: Науковий співробітник; повна вища освіта; володіє знаннями онкології та імунології; знання основних реакції імунології; вміння працювати з лабораторним тваринами та в стерильних умовах.

4.Споживач: хворі на онкологічні захворювання, Міністерство охорони здоров'я.

5.Ринок збуту: Інститут експериментальної паталогії, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького.

6.Конкурентні переваги: біологічний препарат, можливість проведення дослідження в лабораторії ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького, висока ефективність дослідження.

### 3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Таблиця 3.2 – Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища

	Загрози	Можливості
Економіка		
Зміна курсу гривні (інфляція)	Мале фінансування НД установ	Зменшення кількості конкурентів.
Мале фінансування науково-дослідних установ	Зниження швидкості реалізації	Пошук іноземних інвесторів
Політика		
Нестабільне військове положення	Зниження прибутку	Надання робочих місць громадянам з окупованих територій
Географія		
	Високий рівень забрудненості навколишнього середовища	Пошук нових методів отримання лектину на основі мікроорганізмів
Науково-технічний прогрес		
Постійний розвиток технологій виробництва ЛЗ	Поява ефективніших, дешевших, доступніших препаратів	Вдосконалення існуючих методів, поліпшення виробництва
Демографія		
Міграція професійних кадрів закордон	Зменшення кількості вітчизняної робочої сили	Залучення іноземних кадрів

Таблиця 3.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти	Відсутність вітчизняних розробників бактеріальних лектинів  Відсутність схожий технології – відсутність прямих конкурентів	Наявність конкурентів у світі, проте їх технології уступають за ефективністю.



Споживачі	Найкращі фармацевтичні підприємства розташовані неподалік, розташування інституту раку	Мала кількість фармацевтичних підприємств, що випускає інекційні препарати
Постачальники	Власний продуцент лектину	Основні необхідні хімічні реактиви випускаються закродоном

За результатами аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ формуємо перелік зацікавлених сторін (табл.3.4) для визначення потенційних загроз у балах у процесі впровадження.

Таблиця 3.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
<b>Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища</b>			
Виробник:	Забезпечує впровадження результатів стартап проекту	Зацікавлений у впровадженні змін у стартап проекті	70%
Постачальник:	Забезпечує основними реактивам	Зацікавлений в пришвидшені розвитку та збільшенні закупці реактивів	5%
Споживачі:	Забезпечують споживання придбанної продукції	Зацікавлені в кращій якості продукції	10%
Посередники: Не залучаються тому не впливають на розвиток стартап проекту			
Політичні структури:	Беруть участь у формуванні бюджету НД інститутів	Зацікавлені у розвитку науки в Україні	10
Субекти економічного середовища	Банки надають кредитні кошти Інвестори та акціонери розпоряджаються	Зацікавлені у збільшені досліджень	8

	власністю		
Власник географічних об'єктів	Не впливають на проект		
Суб'єкти демографії	Мають вплив на ставлення споживачів до продукції	Зацікавлені у високій якості продукції	3
Суб'єкти культурного середовища	Мають вплив на ставлення споживачів до продукції	Зацікавлені у високій якості продукції	3
Суб'єкти НТП	Забезпечують розвиток НДР	Зацікавлені у впровадженні нових технологій НДР	12

Переваги та недоліки внутрішнього середовища наведено в табл.3.5.

Таблиця 3.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Набір молодих спеціалістів	Можливість працевлаштування для випускників профільних університетів та гідна оплата праці	Потреба в навчанні
Оренда	Менші витрати у порівнянні з будівництвом або купівлею готового приміщення	Обладнання може бути застарілим і можуть виникати проблеми через це
Власне виробництво сировини	Незалежність від поставок, можливість корегувати експлуатаційні властивості	Збільшення витрат на додатковий персонал та дороге обладнання
Розташування лабораторії у великому місті	Дешевші ціни на тарифи, працю, матеріали	Наявність кваліфікованих кадрів; неготовність до переїзду висококваліфікованих

### 3.3 Визначення ключових факторів успіху

На даний момент в Україні не проводиться дослідження показлітинного лектину *Bac. Subtilis IMB B-7724* (крім НАНУ «ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького»).

До сьогоднішнього дня, було досліджено лектин, який продукує *Bac. Subtilis B-7025*. Технологія отримання даного лектину є більш складнішою і потребує додаткових операцій, оскільки на виході ми отримуємо продукт з великою кількістю домішок та більш агресивніший для здорових клітин.

Запропонований нам лектин володіє кращими фізико-хімічними та біологічними властивостями, а метод культивування даного мікроорганізму на качалках дозволяє вже на 2 день отримувати культуральну речовину з великим відсотком цитотоксичної активності.

Тому можна вважати, що при появі даної ідеї на науковому ринку, вона займе лідируючу позицію по ефективності. Ринками збуту крім НАНУ та МОЗУ можуть також виступати закордонні наукові центри по вивченню та пошуку новітніх технологій розробки протипухлинних препаратів.

Оцінка конкурентоспроможності проводилась методом Шонфільда. Оцінка показника якості продукту відбувалась за 5-ти бальною шкалою. Коефіцієнт значущості показника для замовника лежав у межах 0...1 (табл 3.6 рис 13).

Таблиця 3.6 – Оцінка характеристик продукції

№	Характеристика	Коефіцієнт вагомості	Оцінка показника за 5-бальною шкалою	
			<i>Bac. Subtilis IMB B-7724</i>	<i>Bac. Subtilis B-7025</i>
1	Ефективність технології, %	0,3	5	1
2	Затрати на проведення аналізу, грн	0,2	4	5
3	Здатність проводити дослідження у лабораторії НАНУ «ІЕПОР ім. Р.Є.	0,2	5	3

	Кавецького».			
4	Подальша можливість використання продукту після проведення дослідження	0,3	4	2

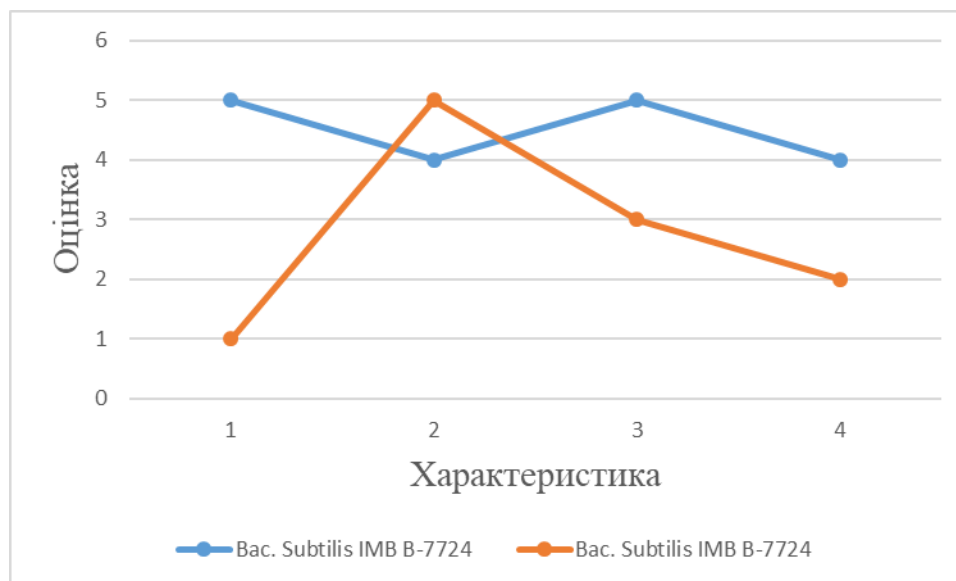


Рисунок 13 – Графічне зображення оцінок конкурентоспроможності, де 1 – ефективність, 2 – затрати на проведення аналізу, 3 – здатність проводити дослідження у лабораторії НАНУ «ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького», 4– Подальша можливість використання продукту після проведення дослідження.

Отже, розроблений продукт є конкурентоспроможним. Ключовим фактором проекту є ефективність технології та здатність використовувати дослідження у лабораторії НАНУ «ІЕПОР ім Р. Є. Кавецького».

Таблиця 3.7 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1. Продаж стартапу	Розробка технології та її продаж
2. Впровадження стартапу	Розробка технології та її впровадження
3. Виробництво	Виробництво ін'єкційного препарату

### 3.4 Визначення потенційних споживачів

Метою оцінки потенційних споживачів є визначення перших клієнтів, які придбають дану стартап-розробку. В табл. 3.8 наведено основні критерії для вибору потенційних споживачів.

Таблиця 3.8 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
<b>Юридична особа</b>	
1. Форма власності	Державне, приватне
2. КВЕД	М 72.1 ( Дослідження та експериментальна розробка в природничих науках)
3. За потужністю (малі, середні, великі)	Малі, середні, великі
4. За масштабом виробництва	Масові
5. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні
6. За ресурсами, що споживаються	Матеріаломісткі, капіталомісткі
7. За чисельністю персоналу	Великі
8. За сферою діяльності	Виробничі, комерційні
9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні
10. За географічним розташуванням	На всій території України
11. За віддаленістю органів управління	Національні
12. За характером господарської діяльності	Фармацевтичне
13. За рівнем технологічної цілісності	Провідні, філії
14. За долею іноземного капіталу	Більше 10 %
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні, корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	Безперервні
17. За роботою протягом року	Позасезонні
18. За географічним розташуванням на території України	Будь-яка
19. За наявністю вільних ОБЗ (коштів)	Наявні

<p>20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Регіон</li> <li>Чисельність населення</li> <li>Динаміка росту регіону</li> <li>Структура регіону</li> <li>Правові обмеження торгівлі</li> </ul>	<p>Великий регіон</p> <p>Чисельність населення більше 100 000</p> <p>Позитивна динаміка росту регіону</p> <p>Структура регіону: великі міста без правових обмежень торгівлі</p>
Фізична особа	
1. Вік	Призначений для будь-якої вікової категорії, що стикнулася з онкологічними проблемами
2. За платоспроможністю (визначити розмір готовності платити за придбання продукту, послуги)	Споживачі будуть готові платити за даний продукт, оскільки він кращий чим хіміотерапія та радіотерапія.
3. За соціальним рівнем споживачів (кількість майна, рівень зарплати, доступ до ресурсів)	Лектин зможуть придбати особи з середнім та високим рівнем достатку
<p>4. За способом життя (звички, традиції, стереотипи поведінки)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Фізичні</li> <li>– Психологічні</li> <li>– Емоційні</li> <li>– Духовні</li> <li>– Соціальні</li> <li>– Інтелектуальні</li> </ul>	Продукт підходить особам, які мають онкологічні захворювання, вірять в успіх лікування та зменшення ймовірності виникнення рецидивів, довіряють новітнім засобам біотехнології.
5. Тип особистості споживачів (традиціоналіст, ідеаліст, фрустрант (низька самооцінка), реаліст, гедоніст (задоволення тут і зараз))	Традиціоналіст, ідеаліст, реаліст.
<p>6. За ставленням до товару</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Мотивація придбання</li> <li>– Пошук вигоди</li> <li>– Ставлення до товару</li> <li>– Інформованість про товар</li> <li>– Інтенсивність споживання товару</li> </ul>	<p>-Покращити стан здоров'я</p> <p>-Повноцінне лікування без використання хіміотерапії</p> <p>- Вимога до якості</p> <p>- Рекомендація від лікарів</p> <p>- До повного видужання</p>
7. За сімейними цінностями (склад сім'ї, рівень сімейного доходу, етап життєвого циклу сім'ї, традиції)	Склад сім'ї та сімейний статус не впливає на вибір продукту. Рівень сімейного доходу повинен бути середній або вище середнього.
8. За співвідношенням бажання придбати і цінової межі (порівняти цифри парами «місячний дохід – вартість одиниці товару»)	Не залежно від ціни, якщо продукт є ефективний при лікуванні онкологічних хворих то споживачі будуть платити за нього. 8000 грн(місячний дохід) – 2000 грн( вартість одиниці продукту)

9. За інтенсивністю споживання товару –Разове придбання –Періодичне придбання –Систематичне придбання	Систематичне придбання
10. За інформованістю (самоосвіта, ЗМІ, спеціальні джерела)	Самоосвіта, ЗМІ, спеціальні джерела

Анкета для споживачів з метою визначення їх бачення запропонованої інновації

1.	Ваша стать:	<input type="checkbox"/> жіноча <input type="checkbox"/> чоловіча
2.	Ваш вік:	<input type="checkbox"/> 16-25 <input type="checkbox"/> 26-35 <input type="checkbox"/> 36-45 <input type="checkbox"/> 46-60 <input type="checkbox"/> від 61
3.	Місце проживання:	<input type="checkbox"/> місто <input type="checkbox"/> смт <input type="checkbox"/> село
4.	Якій продукції Ви надаєте перевагу:	<input type="checkbox"/> екологічній <input type="checkbox"/> дешевшій <input type="checkbox"/> продукції відомої марки
5.	Ваше ставлення біотехнологій:	<input type="checkbox"/> позитивне <input type="checkbox"/> нейтральне <input type="checkbox"/> негативне
6.	Чи стикались Ви з онкологічними хворобами?	<input type="checkbox"/> так <input type="checkbox"/> ні
7.	Чи знаєте ви про імунотерапевтичні заоби?	<input type="checkbox"/> так <input type="checkbox"/> ні
8.	Які методи лікування онкологічних хворих Ви знаєте?	<input type="checkbox"/> хіміотерапія <input type="checkbox"/> імунотерапія <input type="checkbox"/> опромінення
9.	Чи чули Ви про можливість лікування за допомогою лектину?	<input type="checkbox"/> так <input type="checkbox"/> ні
10.	Чи Ви підтримуєте дослідження у галузі біотехнології?	<input type="checkbox"/> так <input type="checkbox"/> ні

Таблиця 3.9 – Основні групи потенційних споживачів та їх потреби

Категорія клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
НАНУ «ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького»	Відкриття нової речовини, віділеної з культуральної речовини <i>Bac. Subtilis IMB B-7724</i>

Онкологічні хворі	Продукт дозволяє покращити лікування онкологічних хворих, та зменшити кількість випадків настання метастазів та рецидивів.
Фармацевтичні компанії	Новий інекційний препарат на основі лектину, який продукує мікроорганізм <i>Bac. Subtilis</i>
МОЗ України	Новий інекційний препарат на основі лектину, який продукує мікроорганізм <i>Bac. Subtilis</i>

Таблиця 3.10 Паспорт основних споживачів

Характеристика	Значення
Організаційно-правова форма	Державна
Класифікація - за потужністю - за чисельністю персоналу - за обсягом виробництва - за сезонністю	мале, мале, мале Несезонне
Розташування	М. Київ
Вид продукту, який потрібний данному споживачеві	Звіт з НДР
Призначення придбаної розробки	Виготовлення препаратів на основі лектину
Кваліфікація персоналу підприємства - робочі -службовці -керівники	Кваліфіковані робітники III та IV розрядів та висококваліфіковані V та VI розрядів. Вантажники, вахтери, прибиральниці, пакувальники – можуть бути малокваліфіковані – ті, що мають I та II розряди та не кваліфіковані
Потенційний обсяг споживання розробки	Звіт з НДР
Хто приймає рішення про придбання розробки	Директор наукового інституту



### 3.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Ціноутворення – це процес обґрунтування, затвердження та перегляду цін і тарифів, визначення їх рівня, співвідношення та структури.

Методи ціноутворення, що ґрунтуються на врахуванні витрат називаються витратними. Розглянемо метод повних витрат. Ціна розраховується, виходячи із суми постійних і змінних витрат на одиницю продукції й запланованого прибутку з урахуванням нижнього порогу ціни.

$$Ц = С + П,$$

де Ц – ціна одиниці товару, грн;

С – собівартість одиниці товару, грн;

П – величина прибутку, яку бажає отримати підприємство від реалізації одиниці товару, грн.

#### 3.5.1 Основні фонди підприємства

Згідно Податкового кодексу термін експлуатації наступних основних фондів та амортизаційні відрахування наведено в таблиці 3.11

Будівлі надано замовником (НАНУ «ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького») для роботи безкоштовно.

Таблиця 3.11 – Вартість основних фондів

№	Найменування	Кількість, шт	Вартість, грн	Норма амортизації, %	Амортизаційні відрахування, грн
1.	Будівлі (склад, лабораторія, виробниче приміщення)	3	0	5	0
2.	Центрифуга	1	4000	20	800
3	Мікроскоп	1	30000	20	6000
4	Термостат	1	13200	20	2640
5	Качалки для культивування	5	5000	20	1000
6	96- лункові планшети	20	1500	20	300
7	Камера Горяєва	1	400	20	80
8	Амінокислотний	1	27000	20	5400

	аналізатор Т339				
9	рН-метр	1	630	20	136
10.	Ємності для лектину	24	100	25	25
11	Чашки Петрі	10	210	20	42
12	Штатив для пробірок	10	1270	20	63,5
13	Піпетки	300	3330	20	660
14	Спиртівка	2	250	20	50
15	Виробничий інвентар	50	5000	20	1000
	<b>Загальна вартість</b>		<b>91890</b>		<b>18196,5</b>

### 3.5.2. Оборотні фонди підприємства

1. Вартість сировини: сировина була надано безкоштовно інститутом мікробіології та вірусології ім. Заболотного.

2. Вартість матеріалів: згідно технології для вирощування *Subtilis IMB B-7724* потрібно 0,001л культури мікроорганізму, які надав безкоштовно інститутом мікробіології та вірусології ім. Заболотного, Аденокарценома Ерліха, яка була надана безкоштовно Інститутом Експериментальної онкології, паталогії та радіобіології ім Р. Є. Кавецького, миші для перевивання пухлинної лінії а також реактиви, які необхідні для дослідження фізико-хімічних та деяких біологічних властивостей та середовище для культивування мікроорганізму : напівсинтетичне середовище Гаузе, фізіологічний розчин, 2% суспензія еритроцитів кроля, повне середовища RPMI–1640, розчин МТТ, спирт, Д-галактозаміном, лактозою, Д-глюкозою, Д-глюкозаміном, фруктозо-1,6-дифосфатом, Д-глюкуроною кислотою, N-ацетілнейраміною кислотою, N-гліколілнейраміною кислотою, ацетатний буфер (рН 6,0), фосфатний буфер (рН 6,5; 7,0), Трис-НСІ буфер (рН 7,5; 8,0; 8,5; 9,0), набір стандартних маркерів білків відомої маси. Вартість реактивів для дослідження наведено у таблиця 3.12 .

Таблиця 3.12 – Кількість необхідних матеріалів для проведення дослідження

Назва реактиву	Кількість необхідна для дослідження л	Ціна за 1 л/г, грн	Ціна втрачена для дослідження, грн
напівсинтетичне середовище Гаузе	2	2303	4606
фізіологічний розчин	1,5	30	45
2% суспензія еритроцитів кроля	0,5	1600	800
повне середовище RPMI–1640	2	1100	2200
Розчин МТТ	0,1	125000	12500
Спирт 96%	2	30	60
Д-галактозамін	0,1	92	9,2
Д-глюкоза	0,1	80	8,0
Лактоза	0,1	120	12,0
Д-глюкозамін	0,1	230	23,0
фруктозо-1,6-дифосфат	0,1	460	46,0
Д-глюкуронова кислота	0,1	10350	1035
Н-ацетілнейрамінова кислота	0,1	18400	1840
Нгліколілнейрамінова кислота	0,1	18400	1840
ацетатний буфер (рН 6,0),	0,5	280	140
фосфатний буфер (рН 7,0),	0,5	280	140

Трис-НСІ буфер (рН 9,0)	0,5	280	140
набір стандартних маркерів білків відомої маси	0,0002	15820( 500 мкл)	6328
<b>Загальна вартість</b>			<b>31727,8</b>

2. Пакування матеріалу після сушки в пластикову ємність об'ємом 100 мл (6 шт), ціною 4 грн. Отже, ціна пакувального матеріалу становить 24 грн.

3. Витрати на електроенергію. Потужність обладнання наведена в таблиці 3.13

Таблиця 3.13 – Спожита електроенергія

Електрообладнання	Потужність, кВт·год	Час використання електрообладнання, год	Час використання обладнання за 2 місяці Год	Використана потужність, кВт·год
Центрифуга	20	3	60	1200
Термостат	0,3	24	1008	302,4
Мікроскоп	0,6	1	20	12
Амінокислотний аналізатор Т339	1,6	4	80	128
рН-метр	1,2	1	20	24
Комп'ютер	1,3	6	240	312
Освітлення	1	5	200	200
<b>Разом</b>				<b>2178,4</b>

Тариф на електричну енергію для юридичних осіб становить 2,5385 грн за кВт·год електроенергії.

$$E=2178,4 \cdot 2,5385=5530 \text{ грн}$$

4. Витрати на водопостачання:

Вода – необхідна складова всіх поживних середовищ. На приготування поживного середовища та реактивів пішло 10 літрів води. На миття посуду витрачається в день 50 літрів води. Для прибирання необхідно 20 л води. Тариф на послуги з централізованого водопостачання та водовідведення для споживачів м. Києва у розмірі 20,376 грн за 1 куб. м

Витрати на водопостачання становлять

$$2,030 \cdot 20,376 = 41,36 \text{ грн.}$$

#### 5. Витрати на ФОП:

$$\text{ФОП} = \text{ЗП} + \text{Нарахування.}$$

До ЗП працівників, що були залучені у процес дослідження лектину були науковий керівник та лаборант із зарплатами 9500 та 1300 грн у місяць. Період дослідження було 2 місяці

$$\text{ФОП} = 21960 \cdot 1,22 = 26352 \text{ грн,}$$

де 1,22 – це нарахування на заробітну плату в розмірі 22 %.

Вартість оборотних засобів підприємства наведена в таблиці 3.14

Таблиця 3.14 – Оборотні засоби підприємства

№	Оборотні засоби	Ціна, грн/рік
1.	Витрати на матеріали	31727,8
2.	Упаковка	24
3.	Витрати на електроенергію	5530
4.	Витрати на водопостачання	41,36
5.	ФОП	26352
<b>Загальна вартість</b>		<b>63675,16</b>

Калькуляція на проведення НДР наведена у таблиці 3.15.

Таблиця 3.15 – Калькуляція на проведення НДР.

№	Статті калькуляції	Сума, грн.
1.	Заробітна плата	26352
2.	Нарахування на заробітну плату	4392
3.	Матеріали	31727,8
4.	Витрати на електроенергію	5530
5.	Витрати на водопостачання	41,36
6.	Амортизація	18196,5
<b>Всього</b>		<b>86239,66</b>

### 3.5.3 Розрахунок собівартості НДР

$$C_{\text{рік}} = \text{ОбЗ} + A = 63675,16 + 18196,5 = 81871,66 \text{ грн/рік.}$$

Де С – собівартість НДР,

ОбЗ – оборотні засоби

А – амортизаційні витрати

**Прибуток** – це частина виручки від реалізації продукції, яка залишилась на підприємстві після компенсації витрат на виробництво і реалізацію та інших обов'язкових платежів. Середня ціна 1 г продукції становить 1000 грн

Так як плановий випуск продукції 100 г/рік, тому

$$C_{\text{пит}} = 81871,66/100 = 818,7 \text{ грн/г}$$

Річний прибуток підприємства:

$$\Pi = K - C$$

$$\Pi = (100 \cdot 1000) - (818,7 \cdot 100) = 18\,130 \text{ грн/рік}$$

Очікуваний прибуток з одиниці продукції: 181,3 грн за реалізацію 1г продукту.

Отже, за витратним методом прогнозована ціна продукту становитиме:

$$\text{Ц} = C + \Pi = 818,7 + 181,3 = 1000 \text{ грн/г.}$$

Капіталовкладення за рік:

$$K = \text{ОФ} + \text{ОбЗ} = 18196,5 + 63675,16 = 81871,66 \text{ грн.}$$

Рентабельність:

$$P = (П/С) \times 100;$$

$$P = (18130 / 81871,66) \times 100 = 22,1\%$$

Термін повернення капіталовкладень:

$$T_{пов.к.} = \frac{K}{П} = \frac{81871,66}{18130} = 4,5 \text{ роки.}$$

Фондовіддача виробничих фондів:

$$\Phi В = (Ц \times В) / ОФ;$$

$$\Phi В = (1000 \times 100) / 18196,5 = 1,82 \text{ грн./грн.}$$

Продуктивність праці:

$$ПП = В / (Ч_{сп} \times Т);$$

$$ПП = 100 / (2 \times 4,5) = 11,1 \text{ грн./ос.}$$

Коефіцієнт економічної ефективності:

$$Е = П/К;$$

$$Е = 18130 / 81871,66 = 0,22$$

Таблиця 3.16 – Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Значення
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	грами	100
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	Осіб	2
3. у тому числі	Осіб	
- основних		2
- інженерно-технічного персоналу		1
4. Середньорічний виробіток робітника	Т/особу	312
5. Капіталовкладення у проект:		
- всього	Грн.	81871,66
- на одиницю продукції	Грн./г.	81,87
6. Повна собівартість	Грн.	81871,66
- всього	Грн/г	81,87
- на одиницю продукції		

7. Відносний прибуток - всього - на одиницю продукції	Грн. Грн./г.	18130 181,30
8. Рентабельність	%	22,14
9. Період повернення капіталовкладень	Років	4,5
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн./грн.	1,82
11. Фондоємкість	Грн./грн.	0,55
12. Продуктивність праці	Грн./особу	11,1
13. Коефіцієнт економічної ефективності		0,22



### 3.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Таблиця 3.17 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу (25 тисячі гривень)	Розробка ідеї; Аналіз ринку; Формування команди; Перевірка потреб споживача; Розробка схем експерименту	Інформаційні, людські, засоби пошуку інформації (комп'ютер, підключений до інтернету), фінансові.	48 год; 10 год; 8 год;  2 год; 48 год;	2 тис грн; 1 тис грн; 13 тис грн;  1 тис грн; 8 тис грн;
Реалізація ідеї (15 тис грн)	Оформлення патенту Заключення договору про намір з банком; Заключення договору про намір з виробником; Заключення договору про намір з точкою збуту.	Людські, фінансові.	40 год;  24 год;  36 год;  36 год;	5 тис грн;  3 тис грн;  4 тис грн;  3 тис грн;
Впровадження у виробництво (41871)	Запуск договорів; Виготовлення	Фінансові, людські.	40 год 100 год	- 41871 грн
Масова реалізація		-	-	-
Закриття або продаж проекту (якщо передано)		-	-	-

Визначено фактори і елементи бізнес-процесів методом системного аналізу (табл. 3.18).

Таблиця 3.18 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи								
	Автор	Команда розробників	Банк	Юрист	Бухгалтер	Маркетолог	Виробник	Реалізатор	Споживач
Розробка ідеї	+								
Аналіз ринку	+					+			
Формування команди	+								
Перевірка потреб споживача	+	+				+			
Розробка схеми експерименту	+	+							
Оформлення патенту	+	+							
Заключення договору про намір з банком	+		+	+					
Заключення договору про намір з виробником	+			+			+		
Заключення договору про намір з точкою збуту	+			+				+	
Запуск договорів	+	+							
Виготовлення		+					+		
Споживче тестування									+

### 3.7 Ризики стартап – проекту та методи управління ними

У розділі визначені найбільш імовірні ризики, які можуть виникнути при реалізації даного проекту

Таблиця 3.19 – Ризики інноваційної розробки

.Назва процесу стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Розробка ідеї;	Підвищення курсу валют, як наслідок підвищення витрат на розробку	Недостатнє фінансування
	Аналіз ринку;	Розробка ефективніших препаратів	Не можливість доставки товару у всі точки збуту
	Формування команди;	Міграція кваліфікованого персоналу за кордон	Велика кількість не кваліфікованих кадрів
	Перевірка потреб споживача;	Покращення стану екології, зниження відсотку захворюваності на онкологічні захворювання	Мала обізнаність про лікування за допомогою препаратів імунотерапії
	Розробка схем експерименту	Відсутність інвестицій	Неможливість використання мікроорганізмів для розробки протипухлинних препаратів
Реалізація ідеї	Оформлення патенту	Наявність в Україні вже готового патенту	Не відповідність патенту дійсності
	Заклучення договору про намір з банком	Інфляція та банкрутство банку	Неспроможність виплати кредиту
	Заклучення договору про намір з виробником	Банкрутство фірми- виробника	Проблеми своєчасного постачання матеріально- технічних ресурсів та реагентів
	Заклучення договору про намір з точкою збуту.	Відмова від реалізації продукції	Рекламації на продану продукцію з причини

			неякісного комплектування
Впровадження у виробництво	Запуск договорів	Підробка документів	Некомпетентність керуючих кадрів
	Виготовлення	Відсутність споживчого попиту на продукт	Необхідність доопрацювання в процесі виробництва технології виготовлення продукції
Масова реалізація	-	-	-
Закриття або продаж проекту	-	-	-
Назва процесу/стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Розробка ідеї;	Підвищення курсу валют, як наслідок підвищення витрат на розробку	Недостатнє фінансування
	Аналіз ринку;	Розробка ефективніших препаратів	Не можливість доставки товару у всі точки збуту
	Формування команди;	Міграція кваліфікованого персоналу за кордон	Велика кількість не кваліфікованих кадрів
	Перевірка потреб споживача;	Покращення стану екології, зниження відсотку захворюваності на онкологічні захворювання	Мала обізнаність про лікування за допомогою препаратів імунотерапії
	Розробка схем експерименту	Відсутність інвестицій	Неможливість використання мікроорганізмів для розробки протипухлинних

			препаратів
Реалізація ідеї	Оформлення патенту	Наявність в Україні вже готового патенту	Не відповідність патенту дійсності
	Заключення договору про намір з банком	Інфляція та банкрутство банку	Неспроможність виплати кредиту
	Заключення договору про намір з виробником	Банкрутство фірми-виробника	Проблеми своєчасного постачання матеріально-технічних ресурсів та реагентів
	Заключення договору про намір з точкою збуту.	Відмова від реалізації продукції	Рекламації на продану продукцію з причини неякісного комплектування
Впровадження у виробництво	Запуск договорів	Підробка документів	Некомпетентність керуючих кадрів
	Виготовлення	Відсутність споживчого попиту на продукт	Необхідність доопрацювання в процесі виробництва технології виготовлення продукції
Масова реалізація	-	-	-
Закриття або продаж проекту	-	-	-

Ступінь впливу на дохід підприємства та ймовірність настання ризиків наведено в таблиці 3.20.

Таблиця 3.20 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризик	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Зовнішні ризики			
Природо-екологічний	Покращення стану екології, зниження відсотку захворюваності на онкологічні захворювання	Низька ймовірність	Середній рівень
Демографічний	Міграція кваліфікованого персоналу за кордон	Висока ймовірність	Високий рівень
Науково-технічний	Розробка ефективніших препаратів	Висока ймовірність	Високий рівень
	Наявність в Україні вже готового патенту	Низька ймовірність	Низький рівень
Ринковий	Підвищення курсу валют, як наслідок підвищення витрат на розробку	Висока ймовірність	Високий рівень
	Інфляція та банкрутство банку	Середня ймовірність	Середній рівень
	Банкрутство фірми-виробника	Низька ймовірність	Низький рівень
	Відмова від реалізації продукції	Середня ймовірність	Високий рівень
	Відсутність споживчого попиту на продукт	Низька ймовірність	Низький рівень
Інвестиційний	Відсутність інвестицій	Середня ймовірність	Середній рівень
Внутрішні ризики			
Комерційний	Неможливість використання	Низька ймовірність	Високий рівень

	мікроорганізмів для розробки протипухлинних препаратів		
Фінансовий	Недостатнє фінансування	Середня ймовірність	Середній рівень
	Неспроможність виплати кредиту	Низька ймовірність	Високий рівень
Організаційний	Велика кількість не кваліфікованих кадрів	Низька ймовірність	Середній рівень
	Проблеми своєчасного постачання матеріально-технічних ресурсів та реагентів	Середня ймовірність	Високий рівень
Технічний	Рекламації на продану продукцію з причини неякісного комплектування	Низька ймовірність	Високий рівень
	Необхідність доопрацювання в процесі виробництва технології виготовлення продукції	Середня ймовірність	Високий рівень
Транспортний	Не можливість доставки товару у всі точки збуту	Середня ймовірність	Середній рівень
Інформаційний	Мала обізнаність про лікування за допомогою препаратів імунотерапії	Висока ймовірність	Високий рівень
Майновий	Не відповідність патенту дійсності	Низька ймовірність	Низький рівень

Групуються всі ризики за критеріями настання та впливом на очікуваний результат у Матриці оцінки ризиків (табл. 3.21)

Таблиця 3.21 – Матриця настання ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику	Числове значення	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
		1	2	3
Високий	3	Неможливість використання мікроорганізмів для розробки протипухлинних препаратів 3	Проблеми своєчасного постачання матеріально-технічних ресурсів та реагентів 6	Міграція кваліфікованого персоналу закордон 9
		Неспроможність виплати кредиту 3	Необхідність допрацювання в процесі виробництва технології виготовлення продукції 6	розробка ефективніших препаратів 9
		Рекламація на продану продукцію з причини неякісного комплектування 3		Підвищення курсу валют, підвищення витрат на розробку 9
				Мала обізнаність про лікування за допомогою препаратів імунотерапії 9
Середній	2	Покращення стану екології	Інфляція та банкрутство банку	Відмова від реалізація продукції



		2	4	6
		Велика кількість некваліфікованого персоналу 2	Відсутність інвестицій 4	
			Недостатнє фінансування 4	
			Неможливість доставки товару у всі точки збуту 4	
Низький	1	Наявність в Україні готового патенту 1		
		Банкруство фірми-виробника 1		
		Відсутність споживачого попиту на продукт 1		
		Невідповідність патенту дійсності 3		

Таблиця 3.22 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Організаційний	Ухилення від ризику	Автор	Затримка постачання матеріально-технологічних ресурсів	Знаходження нових постачальників

Технічний	Попередження ризику	Команда розробників	Необхідність допрацювання технології	Покращення технології
Демографічний	Попередження	Автор	Масовий потік кадрів закордон	Забезпечення кращих умов праці
Комерційний	Попередження	Комада розробників	Відмова від реалізації продукту	Створення більш вигідних умов для компанії-покупців
Інформаційний	Попередження	Комада розробників	Мала інформації про даний засіб	Розповсюдження засобами ЗМІ інформації

## ВИСНОВКИ

1. Позаклітинні метаболіти, присутні в культуральній рідині *B. subtilis* IMB B-7724, виявляють значну гемаглютинуючу та цитотоксичну активність, ступінь вираженості якої залежить від умов аерації культурального середовища. За умов достатньої аерації скорочується термін накопичення в КР біологічно-активних метаболітів та зростає їх активність: за показниками ГАА – в 2 рази, цитотоксичної активності – в 1,3–1,4 разу.

2. Максимальні показники гемаглютинуючої і цитотоксичної активності відмічали на 4-ту добу за достатніх умов аерації (128 титр<sup>-1</sup>РГА та 90,3% відповідно) та на 8-му добу при недостатній кількості кисню (64 титр<sup>-1</sup>РГА і 62,3% відповідно). Тобто для подальшого виділення лектину потрібно використовувати культуральну рідину відповідних діб росту мікроорганізму.

3. Електрофоретичне дослідження лектину, виділеного з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-772, показало, що це достатньо однорідна речовина з молекулярною масою 18-20 кДа, в амінокислотному складі якої превалюють лейцин, аланін, фенілаланін та тирозин.

4. Одержаний лектин є термостабільним в діапазоні температур від 20 до 90<sup>0</sup> С і стійким до зміни рН середовища в діапазоні від .

5. Бізнес ідея яка представлена в даній дисертації є потенційно вигідною за рахунок відсутності на світовому ринку та ринку України аналогів представленої продукції. Даний продукт забезпечує ефективне лікування онкологічних хворих, володіє кращими якостями в порівнянні з хіміотерапією та опроміненням.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Correia M. T. S. Structural Studies on the Interaction of Crataeva tapia Bark Protein with Heparin and other Glycosaminoglycans / M. T. S. Correia, L. C. B. B. Coelho and P. M. G. Paiva // Recent Trends Toxicology – 2008. – 37. – p.47.
2. Olsnes S The history of ricin, abrin and related toxins // Toxicon –2004. – 44. – p.56.
3. Bradberry S Ricin and abrin // Medicine –2007. –35. –p.576.
4. Bayer H. Purification and characterization of ripoximin from Ximenia Americana fruit kernels/ H. Bayer, N. Ey, A. Wattenberg, C. Voss and M. R. Berger// Protein Expres. Purif. – 2012. – 82. – p.97.
5. Sharon N. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined / N. Sharon and H Lis // Trends Biochem. Sci. –1988.–12. –p.488.
6. Boyd W. C. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins) / W. C. Boyd and E. Shapleigh // Science. – 1954. – 119. – p.419.
7. Sharon N. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins / N. Sharon and H. Lis // Science –1972.–177.–p.949.
8. Goldstein I. J. What should be called a lectin / I. J. Goldstein, R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa and N. Sharon // Nature –1980.–285. –p.66.
9. Santos A. F. S. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources / A. F. S. Santos T. H. Napoleão, R. F. Bezerra, E. V. M. M. Carvalho, M. T. S. Correia, P. M. G. Paiva and L. C. B. B. Coelho // Advances in Medicine and Biology –2013.–New York.–63. – p.33.
10. Leite Y. F. M. M. Haemagglutinin of the antarctic seaweed Georgiella conXuens / Y. F. M. M. Leite, Silva, L. M. C. M. Amorim, R. C. N. Freire, D. M. M. Jorge, T. B. Grangeiro and N. M. B. Benevides // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – 1724. – p.137.
11. Jung E. C. mushroom lectin from ascomycete Cordyceps militaris / E. C. Jung, K. D. Kim, C. H. Bae, J. C. Kim, D. K. Kim and H. H. A Kim // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. –1770. –p.833.

12. Santos, A. F. S. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. / A. F. S. Santos, L. A. Luz, A. C. C. Argolo, J. A. Teixeira, P. M. G Paiva and L. C. B. B Coelho // *Process Biochem* – 2009. – 44. –p.504.
13. Araújo R. M. S. Crataeva tapia bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent / R. M. S. Araújo, Ferreira, T. H. Napoleão, M. G Carneiro-da-Cunha, L. C. B. B Coelho, M. T. S. Oliva, M. L. V Correia, and P. M. G Paiva // *Plant Sci.* – 2012. – 183. –p. 20.
14. Francis F. Purification of a new fungal mannose-specific lectin from *Penicillium chrysogenum* and its aphicidal properties / F. Francis, K. Jaber, F. Colinet, D. Portetelle and E. Haubruge // *Fungal Biology* – 2011. –115. – p.1093.
15. Goldstein, I. J. A new alpha-galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes* / I. J. Goldstein, H. C. Winter, J. Aurandt, L. Confer, J. T. Adamson, K. Hakansson and H. Remmer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – 467. –p.268.
16. Wang T. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs / T. Wang, M. Lee and N. Su // *Food Chem.* –2009. –113. – p.1218.
17. Wang T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion / T. Wang, M. Lee and N. Su // *Food Chem.* –2009. – 113. – p.1221
18. Wälti M. A. Structural basis for chitotetraose-coordination by CGL3, a novel galectin-related protein from *Coprinopsis cinerea* / M. A. Wälti, P. J. Walser, S. Thore, A. Grünler, M. Bednar, M. Künzler and M. Aebi // *J. Mol. Biol.* – 2008. – 379. – p.146.
19. Thakur A. Chemical modification and hybridization of wheat germ agglutinins / A. Thakur, M. Rana, T. N. Lakhanpal, A. Ahmad and M. I. Khan // *BBA Gen. Subjects* – 2007. – 1770. – p.1404.
20. Terada T. Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs / T. Terada, Y.

Watanabe, H. Tateno, T. Naganuma, T. Ogawa, K. Muramoto and H. Kamiya // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – 1770. –p. 617.

21.Sharon N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view // Trends Biochem. Sci. – 1993. – 18. –p.221.

22. Sharon N. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. / N. Sharon and H. Lis// J. Agr. Food Chem. – 2002. – 50. – p.6586.

23. Balzarini J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins // Antivir. Res. – 2006. –71. –p.237.

24.Mitra N. Conformational stability of legume lectins reflects their different modes of quaternary association: Solvent denaturation studies on Concanavalin A and Winged Bean Acidic Agglutinin / N. Mitra, V. R. Srinivas, T. N. C. Ramya, N. Ahmad, G. B. Reddy and A. Surolia // Biochemistry. – 2002. – 41. –p. 9256.

25.Sharon N. Lectin-carbohydrate complexes of plants // Trends Biochem. Sci. – 1994. – 10. –p.195.

26.Konidal P Molecular dynamics simulations of pea (*Pisum sativum*) lectin structure with octyl glucoside detergents: the ligand interactions and dynamics / P. Konidal and B. Niemeyer // Biophys. Chem. – 2007. – 128. – p.215

27.Liener I.E. Phytohemagglutinins // Ann. Rev. Plant. Physiol. – 1976. – № 27. – P. 291–319.

28. Lis H. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) // Ann. Rev. Biochem. – 1973. – № 42. – P. 541–573.

29.Suzuki T. Purification, characterization, and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens*. Biosci Biotechnol Biochem / T. Suzuki, Y. Amano, M. Fujita, et al. // – 2009. – 73. – p. 702–709.

30.Zhang G. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. Phytomedicine / G. Zhang, J. Sun, H. Wang, // – 2010. – 17. – p. 775–81.

31.Weiwei Z. Isolation and Characterization of a Novel Lectin from the Edible Mushroom *Stropharia rugosoannulata* / Z. Weiwei, T. Guoting, G. Xueran // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19. – p. 19880–19891

32.Lam S. K. Lectins: prodaction and practical applications. // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2011. – 89. – p. 45-55.

33.Игнатов В. В. Углеводузнающие белки – лектины // *Соросовский образовательный журнал*. – 1997. – №2. – с. 14-20.

34.Луцик М. Д. Лектины, их получение и применение в исследовании гликопротеинов клеточных мембран // *Автореферат дис.докт биол наук (03.00.04, Биохимия)*. – Киев – 1989. – с. 21.

35.Галич И.П. Изменение гликозилирования при окногенезе и развитии других патологических процессов / И.П. Галич, Н.В. Евтушенко // *Онкология* – 2003. – 5. – стр.4–8.

36. Li W.W. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics / W.W. Li, J.Y. Yu, H.L. Xu, J.K. Bao// *Biochem. Biophys. Res. Commun* – 2011. – 414. – p.282–286.

37. Сербин М. Е., Щербак Е. В. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // *Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сборник / под редакцией проф., д. м. н. Н. Н. Ильинских*. — Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2004. — Вып. 1. ]

38.Мишуніна Т.М. Основні молекулярні механізми апоптозу та їх порушення при канцерогенезі щитоподібної залози (огляд літератури) / Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. // *Журн. АМН України*. — 2006. — Т. 12, № 4. — С. 611-633

39.Сербин М. Е. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // *Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сборник / под редакцией проф., д. м. н. Н. Н. Ильинских*. — Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2004. — Вып. 1.

40.Гордеева А. В. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция / А. В. Гордеева, Ю. А. Лабас, Р. А. Звягильская // Биохимия. — 2004. — Т. 69, вып. 10. — С. 1301—1313.

41. Adams J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis/J. M. Adams//Genes and Development. -2003. -N 17. -P. 2481–2495.

42. Нагорнев В. А. Апоптоз и его роль в атерогенезе / В. А. Нагорнев, А. Н. Восканьянц//Медицинский академический журнал – 2003. – Т. 3, № 4. – с. 3–18.

43. Робинсон М. В. Апоптоз клеток иммунной системы/М. В. Робинсон, В. А. Труфакин//Успехи современной биологии – 1991. – Т. 3, вып. 2. – с. 246–259.

44.Шамитова Е. Н. Митохондриальный путь гибели клеток / Е. Н. Шамитова, Д. А. Эркенов // Молодой ученый. — 2017. — №41. — с. 15-17.

45.Fu L. L. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents / L. L. Fu, C. C. Zhou, S. Yao, et al. // Int JBiochem Cell Biol. – 2011. – 43. – p. 1442-1449.

46.Танасієнко О. А, Доповіді Національної академії наук України. / О. А. Танасієнко, Г. П. Потебня, З. М. Олевінська, М. Я. Співак // 2013. – № 1. – с. 185-191.

47.Marvibaigi M. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer / M. Marvibaigi, E. Supriyanto, N. Amini, et al. // BiomedRes Int. – 2014. – 2. – p. 1-15.

48. Кочубей Т. О. Вплив фітогемаглютиніну і його ізолектинів на життєздатність та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro* / Автореф дис канд біол наук (03.00.03 – молекулярна біологія) // – Київ. – 2017. – с. 22.

49.Choi S. H. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt / S. H. Choi, S. Y. Lyu, W. B. Park // Arch Pharm Res. – 2004. – 27. – p. 68-76.

50.Zhang G. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a Russula mushroom / G. Zhang, J. Sun, H. Wang, et al. // Phytomedicine. – 2010. – 17. – p. 775-81.



51.Jiang S. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine / S. Jiang, Y. Chen, M. Wang, et al. // *Biochem J.* – 2012. – 443. – p. 369-378.

52.Loser K. Galectin-2 Suppresses Contact Allergy by Inducing Apoptosis in Activated CD8+ T Cells. / K. Loser, A. Sturm, M. Voskor // *J Immunol.* – 2009. – 182. – p. 5419–5429.

53.Rossi G. R. Effective Treatment of Preexisting Melanoma with Whole Cell Vaccines Expressing  $\alpha(1,3)$ -Galactosyl Epitopes / G. R. Rossi, M. R. Mautino, R. C. Unfer, et al. // *Cancer Res.* – 2005. – 65. – p. 10555–10561.

54. Behjatolah M.-K. Reduction of Spontaneous Metastases through Induction of Carbohydrate Cross-Reactive Apoptotic Antibodies / M.-K. Behjatolah, A. Cecile, J. Fariba, et al. // *J Immunol.* – 2005. – 174. – p. 7057–65.

55.Timoshenko A. V. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination. effects on tumour growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production / A. V. Timoshenko, Y. Lan, H. J. Gabius // *Eur J Cancer.* – 2001. – 37 (15). – p. 1910–1920.

56.Klibi J. Blood diffusion and Th1- suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus–infected nasopharyngeal carcinoma cells / J. Klibi, T. Niki, A. Riedel, et al. // *Blood.* – 2009. – 113(9). – p.1957–1966.

57.Thebault P. The C-Type Lectin-Like Receptor CLEC-1, Expressed by Myeloid Cells and Endothelial Cells, Is Up-Regulated by Immunoregulatory Mediators and Moderates T Cell Activation / P. Thebault, N. Lhermite, G. Tilly, et al. // *J Immunol.* – 2009. – 183. – p. 3099–4108.

58. Baldus S. E. Thomsen–Friedenreich antigen presents as a prognostic factor in colorectal carcinoma: a clinicopathologic study of 264 patients. / S. E. Baldus, T. K. Zirbes, // *Cancer.* – 2000. – Vol. 88. – p.1536–1543.

59. Kannan S. Expression of peanut agglutinin-binding mucin-type glycoprotein in human esophageal squamous cell peanut agglutinin as a marker. / S. Kannan, R.A. Lakku, D. Niranjali et al. // *Mol Cancer.* – 2003. – № 1. – p.38 -45.

60.Антонюк Р. В. Лектиногістохімічне дослідження товстої кишки людини в нормі та при неопластичних процесах з використанням лектинів, специфічних до Т-Антигену та N-Ацетиллактозаміну / Р. В. Антонюк, О. Д. Луцик // Світ медицини та біології. – 2015. – № 2(49). – с. 73-79.

61.Chekhun V.F., Didenko G.V., Cheremshenko N.L., et al. [Strain of bacteria *Bacillus subtilis* IMB B-7724 – producer of cytotoxic substances with antitumor activity (Pat. №131824 UA)]. Publ. 25.01.2019. Bul. №2. Ukrainian

62.Podgorsky VS. The method for the obtainmen of bacterial lectin, specific to sialic acids (Pat. № 1791 UA). Publ. 23.01.1991. Bul. №1.

63.Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та інші // К. – 2002. – с. 179.

64.Stefanov A.V. Preclinical research of medicinal products: Methodical recommendations // К. – Avicenna. – 2002. – p. 568.

65.Клаус Дж. Лимфоциты. Методы // М.– Мир – 1990. – с. 395.

66.Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. – 1970. –T4. 227.–5.

67.Dam T. K. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptorinteractions / T.K. Dam, C.F. Brewer // Biochemistry – 2008. – 47. – 8476–85.

68.Lutsik M.D. Lectins / M.D. Lutsik, E.N. Panasyuk, A. D. Lutsik // L'vov. – Vishcha shkola. – 1981. – с .155.

69.Eghianruwa Q Physicochemical properties and acute toxicity studies of a lectin from the saline extract of the fruiting bodies of the shiitake mushroom, *Lentinula edodes* / Q. Eghianruwa, O. Odekanyin, A. Kuku // Int J Biochem Mol Biol. – 2011. – 2. – 309.–17.

70.Muhammadiev R. S. Physico-chemical properties of the lectin micromycete *Rhizoctonia solani* / R. S. Muhammadiev, A. N. Ibragimov, T. V. Bagaeva. // Bulletin

of biotechnology and physico-chemical biology named after YuA Ovchinnikova – 2016. – 16. – с.23–28.

71.Сиденко А. В. Теория статистики / А. В. Сиденко, В. В. Вишняков, С. М. Исаев // Учебник. – МАКС-Пресс. – 2011. – с. 343.

72.Potebnya G.P. Use of cytotoxic lectins of bacterial origin in immunotherapy of experimental tumors. In: Structure and biological activity of bacterial biopolymers / G.P. Potebnya, O.A. Tanasienko, G.S Lisovenko, Z.D. Savtsova //Ed. VK Pozur. K. Vyd-polygr Center "Kyiv University" – 2003. – 235–p. 304.

73.Tanasienko O.A. The induction of antitumor resistance in mice by cytotoxic lectin of bacterial origin / O.A. Tanasienko, M.P. Rudik, G.P Titova. G.P. Potebnya // Microbiology and Biotechnology – 2010. – 2(10). – p.59–65

74.Kobelev A.V. Dependence of lectin biosynthesis on the growth of sulphate-reducing bacteria and nutrient medium components / A.V. Kobelev, T.V. Vdovina, T.V. Bagaeva // Bull. Univ. Technol. – 2017. – 20(11). –p.125–129.

75.Contesini F.J. An overview of Bacillus proteases: from production to application / F.J Contesini , R. R. Melo , H.H Sato // Crit. Rev. Biotechnol. –2018. – 38(3). –p.321–34.

76.Nydyalkova N.A. Optimization of the medium for the synthesis of fibrinolytic peptidase Bacillus thuringiensis IMV B-7324 / N.A. Nydyalkova, O.V. Matselyukh, L.D. Varbanets // Biotechnologia Acta – 2012. – 5(4). – p.74–81.

77.Потебня Г. П. Закономерности биосинтеза цитотоксических лектинов культурой Bacillus subtilis B-7025 при выращивании на разных питательных средах / Г. П. Потебня, О. А. Танасиенко, Н. Л. Черемшенко // Укр химиотер журн. – 2002. – 1 (13). – с.54-7.